

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Kristýna Jelšíková

**VÝVOJ ELEKTROANALYTICKÝCH METOD PRO
DETEKCI ŽLUČOVÝCH KYSELIN OBSAHUJÍCÍCH
7 α HYDROXYLOVOU SKUPINU**

Development of electroanalytical methods for
detection of bile acids possessing 7 α hydroxyl group

Diplomová práce

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

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala 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 je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 13. srpna 2020

Bc. Kristýna Jelšíková

Abstrakt:

Obsahem této diplomové práce je studium elektrochemických procesů vybraných žlučových kyselin, které obsahují 7 α hydroxylovou skupinu (cholová, chenodeoxycholová a α -muricholová). Měření probíhala na borem dopované diamantové elektrodě v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé (obsah vody 0,55 %) metodou cyklické voltametrie. Je známo, že za pomoci dehydratační reakce mezi kyselinou chloristou a 7 α žlučovou kyselinou dojde ke zvýšení elektrochemické aktivity 7 α žlučové kyseliny. Předmětem studia byla stabilita voltametrické odezvy takto chemicky aktivovaných žlučových kyselin v oblasti záporných potenciálů. Bylo zjištěno, že pro získání katodického signálu 7 α žlučových kyselin je důležitá přítomnost kyslíku v měřeném roztoku. Ten nejspíše plní regenerační funkci, v jeho přítomnosti dochází ke zpětné oxidaci produktu elektrochemické redukce, a tím ke zvýšení voltametrického signálu. Zároveň je důležité, aby sken v cyklické voltametii nejprve směřoval do pozitivních hodnot, kdy musí být dosaženo potenciálu +2,0 V (*vs.* Ag/AgNO₃ v acetonitrilu), kdy dochází k tvorbě HO• radikálů, právě jejichž působením nejspíše vzniká ten produkt(y) oxidace žlučových kyselin, které je následně možné redukovat. Poté je dosaženo katodické odezvy studovaných žlučových kyselin při *ca* -0,40 V (chenodeoxycholová kyselina), -0,30 V (cholová kyselina) a -0,35 V (α -muricholová kyselina).

Klíčová slova:

Borem dopovaná diamantová elektroda, dehydratace, oxidace, redukce, voltametrie, žlučové kyseliny

Abstract:

This master's thesis contains a study of electrochemical processes of selected bile acids possessing 7α hydroxyl group (cholic, chenodeoxycholic and α -muricholic). The measurements were performed on boron-doped diamond electrode in the non-aqueous medium of acetonitrile and perchloric acid (water content 0.55 %) by cyclic voltammetry. It is known that the electrochemical activity of 7α bile acids is increased by a dehydration reaction between perchloric acid and the 7α bile acid. The subject of the study was the stability of the voltammetric response of chemically activated bile acids in the region of negative potentials. It was found that the presence of oxygen in the measured solution is an important factor for obtaining the cathodic signal of 7α bile acids. It probably performs a regenerative function; the product of the electrochemical reduction is re-oxidized in its presence, which leads to an increase in the voltammetric response. At the same time, it is important that the direction of the scan in cyclic voltammetry first proceeds to positive values. A potential of +2.0 V (*vs.* Ag/AgNO₃ in acetonitrile) must be reached for the HO• radicals to be formed. It is these radicals that presumably lead to the formation of the product(s) of bile acids electrochemical oxidation that can be subsequently reduced. Then, the cathodic response of the studied bile acids is achieved at *ca* -0.40 V (chenodeoxycholic acid), -0.30 V (cholic acid) and -0.35 V (α -muricholic acid).

Key words:

Boron doped diamond electrode, dehydration, oxidation, reduction, voltammetry, bile acids

Tato práce vznikla s podporou Grantové agentury České republiky (projekt 19-11268S)

Poděkování

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala mé školitelce doc. RNDr. Karolině Schwarzové, Ph.D. za její cenné rady, připomínky a veškerou pomoc během vypracovávání této práce. Dále bych zde chtěla poděkovat Mgr. Janu Kloudovi, za užitečné rady a připomínky během experimentální činnosti a jeho čas věnovaný čtení a připomínkám při samotném sepisování této diplomové práce. Poděkování patří také mé rodině za všechnu podporu během mého vysokoškolského studia.

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod	9
2 Teoretická část	10
2.1 Žlučové kyseliny	10
2.1.1 Struktura žlučových kyselin	10
2.1.2 Fyzikálně–chemické vlastnosti žlučových kyselin	12
2.1.3 Biochemie žlučových kyselin	14
2.1.4 Studované žlučové kyseliny	16
2.1.5 Elektrochemické vlastnosti žlučových kyselin	18
2.2 Analytické stanovení žlučových kyselin	21
3 Experimentální část	28
3.1 Studované látky a použité chemikálie	28
3.2 Metody měření	28
3.3 Pracovní postup a zpracování dat	29
4 Výsledky a diskuze	30
4.1 Charakterizace BDD elektrody	30
4.2 Vliv základního elektrolytu na voltametrickou odezvu žlučových kyselin	33
4.3 Studium podmínek pro detekci žlučových kyselin v oblasti záporných potenciálů	37
4.3.1 Chenodeoxycholová kyselina	39
4.3.2 Cholová kyselina	44
4.3.3 α –muricholová kyselina	47
4.4 Vliv podmínek zahřívání chenodeoxycholové kyseliny na tvorbu odezvy v oblasti záporných potenciálů	49

5 Závěr	53
Seznam literatury	56

Seznam zkratek

α -MCA	α -muricholová kyselina
BDD	borem dopovaný diamant
c	molární koncentrace [mol l^{-1}]
CA	cholová kyselina
CDCA	chenodeoxycholová kyselina
CMC	kritická micelární koncentrace
CV	cyklická voltametrie
E	potenciál [V]
E_p	potenciál píku [V]
ECD	detektor elektronového záchytu
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FID	plamenově ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I	proud [μA]
I_p	proud píku [μA]
LOD	limit detekce
MS	hmotnostní detektor
NMR	nukleární magnetická resonance
SFC	superkritická fluidní chromatografie
t	čas [min]
TBA	celkové množství žlučových kyselin
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
v	rychlost skenu [V s^{-1}]

1 Úvod

Cílem této diplomové práce je studium elektrochemického chování vybraných žlučových kyselin na borem dopované diamantové elektrodě v prostředí acetonitril – kyselina chloristá a následné využití probíhajících redoxních reakcí v elektroanalytických metodách.

Elektrochemické chování žlučových kyselin na borem dopované diamantové elektrodě bylo již popsáno v pracích Kloudy *et. al*[1–3]. Ten v nich popsal možnost elektrochemické oxidace těchto látek po předchozí dehydrataci v prostředí acetonitril – kyselina chloristá. Vzniklý dehydratační produkt žlučových kyselin je náchylnější k elektrochemické oxidaci a následkem toho je možné pozorovat odezvu v oblastech kladných potenciálů. Tato diplomová práce se z části opírá o jím získané poznatky o elektrochemickém chování cholové a chenodeoxycholové kyseliny a rozšiřuje je o studium α -muricholové kyseliny za obdobných podmínek. V rámci této studie bylo zjištěno, že oxidační produkty jmenovaných žlučových kyselin je možno redukovat. Tato práce je tedy dále věnována studiu těchto redukčních signálů a možnostem jejich využití pro detekci uvedených žlučových kyselin ve voltametii.

Práce je součástí širšího projektu studia elektrochemických vlastností steroidních sloučenin probíhajícího v UNESCO laboratoři elektrochemie životního prostředí na katedře analytické chemie PřF UK.

2 Teoretická část

2.1 Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny patří mezi organické sloučeniny, jejichž rozmanitá struktura je důsledkem biochemických přeměn cholesterolu v živých organismech. Samotné žlučové kyseliny byly izolovány v 19. století ze žluče, v té době však ještě nebyla známa jejich chemická struktura, proto je většina žlučových kyselin pojmenována podle organismu, ze kterého byla daná žlučová kyselina izolována. Příkladem může být tauroursodeoxycholová kyselina, která je pojmenována podle latinského označení býka, *taurus*, nebo v této práci studovaná α -muricholová kyselina. Ta je pojmenována podle latinského označení myši, *mus*, konkrétně se jedná o dativ singuláru substantiva – *muri* [4].

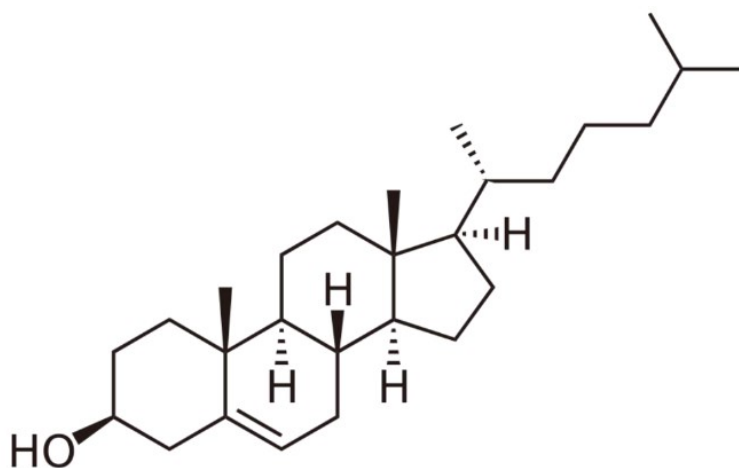
Žlučové kyseliny vznikají jako produkty metabolismu cholesterolu. Vznikají v játrech a hromadí se ve žlučníku, odkud jsou žlučovody vylučovány do tenkého střeva. Zde se podílejí na metabolismu lipidů, konkrétně fungují jako emulgátory tuků, tvoří s nimi micely. Tím se povrch tuku zvětšuje a dochází ke snadnějšímu štěpení lipasami, z tohoto důvodu se zřejmě jedná o nejdůležitější biologicky povrchově aktivní látky. Také napomáhají vstřebávání a rozpouštění vitamínů rozpustných v tucích. Z tenkého střeva jsou žlučové kyseliny reabsorbovány zpět do oběhu a do jater, tento fyziologický jev se nazývá enterohepatální cyklus [5].

2.1.1 Struktura žlučových kyselin

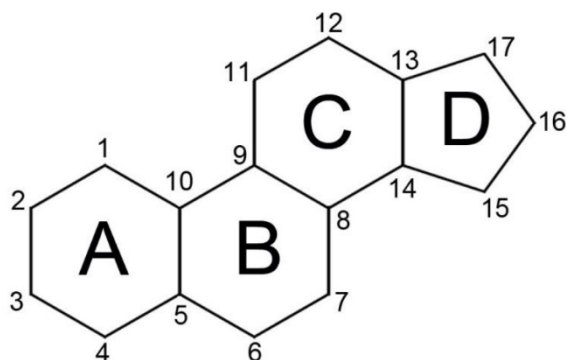
Žlučové kyseliny patří mezi steroidní látky, které v organismech vznikají z cholesterolu (obr. 1) v důsledku mnoha reakcí. Základem jejich struktury je vždy steroidní jádro – steran (obr. 2). Ten tvoří tři šestiuhlíkaté

kruhy (značeny A, B, C) a jeden pětiuhlíkatý kruh (značen D). Ve struktuře každé žlučové kyseliny je vždy přítomna jedna karboxylová skupina, která se vyskytuje na posledním uhlíku v postranním alifatickém řetězci na C₁₇ a několik hydroxylových skupin (jedna je vždy umístěna v poloze C₃), popřípadě se zde mohou objevovat i ketoskupiny. Jednotlivé žlučové kyseliny se od sebe odlišují množstvím a pozicí hydroxylových skupin.

Rozlišujeme dvě základní skupiny žlučových kyselin, a to na základě počtu atomů uhlíku. Rozdíl je daný odlišnou délkou postranního řetězce navázaného v pozici C₁₇. První skupinou jsou cholanové žlučové kyseliny – celkový počet uhlíků ve struktuře těchto žlučových kyselin je dvacet čtyři (tj. délka postranního řetězce je pět uhlíků). Druhou skupinou jsou cholestanové žlučové kyseliny, ty mají celkový počet uhlíků dvacet sedm (tj. délka postranního řetězce je osm uhlíků). Tyto dvě skupiny zahrnují většinu známých žlučových kyselin. U savců dominují žlučové kyseliny s dvaceti čtyřmi uhlíky. Ty navíc mohou tvořit konjugáty, nejčastěji s glycinem a taurinem, což vede ke zvýšení jejich rozpustnosti za fyziologických podmínek. Struktury vybraných žlučových kyselin se nacházejí v tab. 1.



Obr. 1 Struktura cholesterolu.



Obr. 2 Struktura steranu včetně způsobu značení a číslování steroidního jádra.

Tab. 1 Chemická struktura vybraných žlučových kyselin.

kyselina	kruh A	kruh B	kruh C	kruh D
cholová	3 α OH	7 α OH	12 α OH	17 C(CH ₃)CH ₂ CH ₂ COOH
chenodeoxycholová	3 α OH	7 α OH		17 C(CH ₃)CH ₂ CH ₂ COOH
deoxycholová	3 α OH		12 α OH	17 C(CH ₃)CH ₂ CH ₂ COOH
α -muricholová	3 α OH	6 β OH 7 α OH		17 C(CH ₃)CH ₂ CH ₂ COOH

2.1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti žlučových kyselin

Žlučové kyseliny jsou charakteristické svou hydrofilní α stranou a hydrofobní β stranou [5]. Z této struktury vyplývá jejich amfipatický charakter díky němuž se žlučové kyseliny v koncentracích vyšších, než je jejich kritická micelární koncentrace (CMC), ve vodném prostředí shlukují do micel [6]. Tvorba micel není dána pouze hydrofobní efektem, ale i tvorbou

vodíkových můstků mezi hydroxylovými skupinami. S přibývajícím počtem hydroxylových skupin a ketoskupin narůstá i CMC příslušné kyseliny. Pokud mají dvě žlučové kyseliny stejný počet substituentů, vyšší CMC má ta, u které je hydroxylová skupina nahrazena ketoskupinou [6].

Rozpustnost žlučových kyselin je ovlivněna pH vodného roztoku a pK_a žlučových kyselin. Hodnota pK_a nekonjugovaných žlučových kyselin je přibližně 5, proto je při neutrálním pH velké množství nekonjugovaných žlučových kyselin pouze omezeně rozpustné [7]. Rozpustnost žlučových kyselin je také ovlivněna přítomností a orientací hydroxylových skupin na steroidním jádře. Pokud jsou žlučové kyseliny konjugovány s glycinem nebo taurinem dochází ke snížení hodnoty pK_a , čímž je docíleno lepší rozpustnosti při neutrálním pH vodného roztoku. Hodnota pK_a žlučových kyselin konjugovaných s glycinem je přibližně 4,5, v případě žlučových kyselin konjugovaných s taurinem, obsahujícím silně kyselou sulfonovou skupinu, je hodnota pK_a snížena dokonce na 1,5. V případě běžných chromatografických metod, kdy se hodnota pH vodného roztoku pohybuje mezi 3–10 jsou konjugáty s taurinem vždy ve formě ionizované, u nekonjugovaných žlučových kyselin a konjugátů s glycinem záleží na pH vodného roztoku. Obecně je možné říci, že rozpustnost žlučových kyselin nekonjugovaných i konjugovaných s glycinem roste s rostoucím pH, dokud není dosaženo CMC, od té doby se jejich rozpustnost stává prakticky neomezenou. *In vivo* se žlučové kyseliny vyskytují jako protonované kyseliny, které jsou nerozpuštěné i rozpuštěné, jako aniont kyseliny nebo jako nerozpustná sůl, nejčastěji s Ca^{2+} [8].

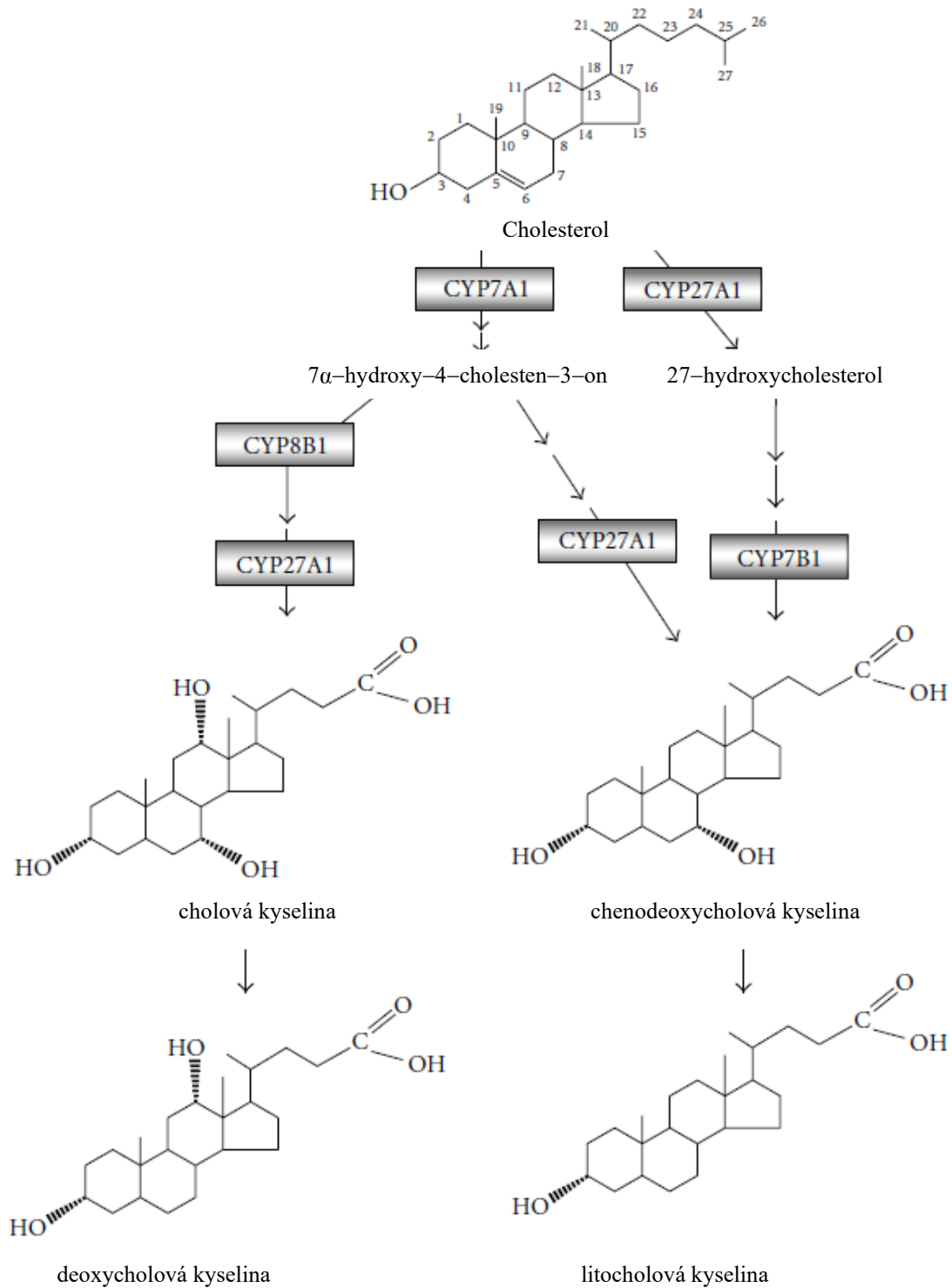
Hydrofilita žlučových kyselin je ovlivněna počtem, pozicí i množstvím hydroxylových skupin. Mezi polárnější patří ty, které mají ve své struktuře přítomno více hydroxylových skupin, také záleží na prostorové orientaci těchto skupin. Žlučové kyseliny, které mají hydroxylové skupiny přítomny pouze v poloze α , jsou méně polární než žlučové kyseliny mající tyto skupiny i v pozici β . Nejvíce hydrofilními jsou muricholové kyseliny [8,9].

2.1.3 Biochemie žlučových kyselin

K syntéze žlučových kyselin dochází v játrech, konkrétně v hepatocytech, metabolismem cholesterolu. Žlučové kyseliny, které vznikají přímo v játrech, jsou nazývány jako primární žlučové kyseliny – v lidském organismu jsou to cholová kyselina a chenodeoxcholová kyselina. Primární žlučové kyseliny mohou dále podléhat působení bakterií, tímto způsobem vznikají sekundární žlučové kyseliny – v lidském organismu jsou to převážně deoxycholová kyselina (vznikající dehydroxylací cholové kyseliny na C₇) a lithocholová kyselina (vznikající dehydroxylací chenocholové kyseliny na C₇).

K syntéze žlučových kyselin z cholesterolu dochází působením enzymů z rodiny cytochromu P450 [10]. Cholesterol je dvacetí sedmi uhlíkatý sterol, jehož základní strukturu tvoří steran s dvojnou vazbou na C₅ a izooktanovým postranním řetězcem na C₁₇. V pozici C₁₀ a C₁₃ má navázané methylové skupiny. Metabolismus cholesterolu je velmi podobný reakcím standardních metabolismů (eliminace xenobiotik). Jde především o hydroxylaci, oxidaci a konjugaci [11].

Pro metabolismus cholesterolu, který je znázorněn na obr. 3, je typické nasycení dvojně vazby mezi C₅ a C₆, dále epimerizace 3β-hydroxylové skupiny, popřípadě může dojít k navázání hydroxylové skupiny nebo oxoskupin v pozici 7α a 12α [12]. Následně dojde k oxidaci postranního osmuhlíkatého řetězce, který je vázán na C₁₇, na C₂₄ karboxylovou kyselinu. C₂₄ žlučové kyseliny jsou následně aktivovány za přítomnosti koenzymu A a konjugovány s glycinem nebo tauriem [10]. Ke konjugaci dochází mezi karboxylovou skupinou žlučové kyseliny a amino skupinou glycinu/taurinu za vzniku amidové vazby. Ke konjugaci může dojít i jinými způsoby, například sulfatací, etherovou konjugací nebo esterovou glukoronidací.



Obr. 3 Biosyntéza žlučových kyselin v organismu savců. Upraveno z [13].

Primární žlučové kyseliny, které vznikají v játrech, jsou dále vylučovány do střeva, kde mohou být dále metabolizovány vlivem mikroorganismů, které se ve střevě nacházejí. Těmito modifikacemi vznikají tzv. sekundární žlučové kyseliny. Díky enterohepatálnímu cyklu je většina žlučových kyselin ve střevě reabsorbována a portální krví vedena zpět do jater. Tento metabolismus je znám u většiny savců, především pak u organismu člověka. Primárními žlučovými kyselinami zde jsou cholová a chenodeoxycholová kyselina (konečný produkt v lidských játrech), ty jsou modifikovány na sekundární žlučové kyseliny, jejichž zástupci jsou deoxycholová a lithocholová kyselina [14].

Pro metabolismus žlučových kyselin u myši jsou typické jiné mechanismy. Zatímco v lidském organismu je v játrech, jak již bylo zmíněno, konečným produktem chenodeoxycholová kyselina, v myších játrech je tato žlučová kyselina metabolizována na hydrofilní muricholové kyseliny [15,16].

2.1.4 Studované žlučové kyseliny

Pro studium byly vybrány tři žlučové kyseliny, a to cholová kyselina, chenodeoxycholová kyselina a α -muricholová kyselina (obr. 4). V tabulce 2 jsou uvedeny konkrétní hodnoty CMC a rozpustnosti ve vodě pro dané žlučové kyseliny

Cholová kyselina

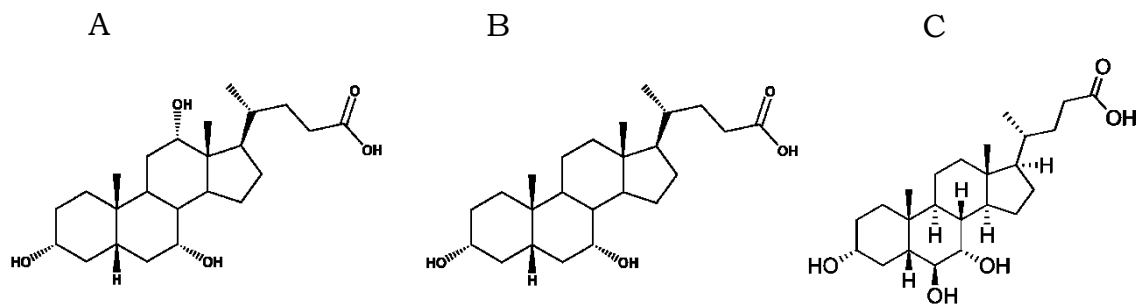
Jedná se o bezbarvý nebo bílý prášek. Velmi špatně je rozpustná ve vodě, dobře se rozpouští v ethanolu. Její relativní molekulová hmotnost je 408,29 a sumární vzorec této kyseliny je $C_{24}H_{40}O_5$ [17]. Tato primární žlučová kyselina je steroidní sloučenina, která vzniká oxidací cholesterolu. Jedním z produktů jejího dalšího metabolismu je deoxycholová kyselina.

Chenodeoxycholová kyselina

Jedná se o bílý nebo téměř bílý prášek. Je velmi těžce rozpustná ve vodě a dichlormethanu, snadno rozpustná v ethanolu a dobře rozpustná v acetonu. Její relativní molekulová hmotnost je rovna 392,56 a její sumární vzorec je $C_{24}H_{40}O_4$ [18]. Tato primární žlučová kyselina je steroidní sloučenina, která vzniká oxidací cholesterolu. Jedním z produktů jejího dalšího metabolismu je lithocholová kyselina.

α -muricholová kyselina

Jedná se o bílý prášek. Stejně jako předešlé žlučové kyseliny je tato kyselina špatně rozpustná ve vodě a dobře například v ethanolu. Její sumární vzorec je $C_{24}H_{40}O_5$ a její relativní molekulární hmotnost je 408,29. Patří do skupiny žlučových kyselin, které se označují jednotným názvem – muricholová kyselina a vyskytují se u myší, v menší míře i u jiných organismů. Tyto žlučové kyseliny se od primárních žlučových kyselin člověka liší hydroxylovou skupinou v konformaci α nebo β na C_6 . α -muricholová kyselina má hydroxylové skupiny v pozici α na C_7 a β na C_6 [19].



Obr. 4 Struktury studovaných kyselin: A – cholová kyselina, B – chenodeoxycholová kyselina a C – α -muricholová kyselina.

Tab. 2 Hodnoty CMC a rozpustnosti ve vodě pro studované žlučové kyseliny.

Žluč. kyselina	CMC ve vodě (mmol l⁻¹) [20]	Rozpustnost ve vodě 20°C (mg l⁻¹)
CA	13	175 [17]
CDCA	7	90 [21]
α -MCA	nenalezena	69 [19]

2.1.5 Elektrochemické vlastnosti žlučových kyselin

Jak již bylo zmíněno výše žlučové kyseliny se svou strukturou řadí mezi steroidy. Samo jádro steroidů, které tvoří steran je elektrochemicky neaktivní. Elektrochemické vlastnosti steroidů jsou tak závislé na přítomnosti funkčních skupin, které jsou na jádro navázány a na přítomnosti dvojných vazeb uvnitř jádra [23].

Žlučové kyseliny nepatří mezi výrazné elektrochemicky aktivní látky, z toho důvodu neexistuje mnoho publikací a výzkumů, které by se jimi zabývaly. Do roku 2012 problematiku elektrochemie žlučových kyselin ve svém přehledném článku shrnuli Nesměrák a Pecková [24]. V roce 2017 pak další poznatky ohledně elektrochemických vlastností steroidů shrnul ve své práci Klouda *et al* .[23].

Redukce žlučových kyselin

Množství studií věnované redukčním procesům žlučových kyselin není velké. Jedním z materiálů, na kterém bylo studováno redukční chování žlučových kyselin byla rtuťová kapající elektroda. Byla použita pro diferenční pulsní polarografii při stanovení cholové, deoxycholové, ursodeoxycholové, chenodeoxycholové a lithocholové kyseliny v lidské žluči nebo

ve farmakách [25]. Elektrochemická aktivita žlučových kyselin je charakterizována pomocí píku vyvinutého u potenciálu -1150 mV až -1350 mV, přičemž tento pík není závislý na pH prostředí. Vzhledem k blízkosti redukčních potenciálů jednotlivých žlučových kyselin je možné tuto metodu považovat za vhodnou pro stanovení celkového množství žlučových kyselin ve žluči (možno stanovit mikromolární koncentrace) [25].

Elektrochemická redukce deoxycholové kyseliny byla také studována na elektrodě ze skelného uhlíku. Měření probíhalo v $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ v prostředí voda/methanol (1:1), žádná redukční odezva pozorována nebyla.[26] Dále byla studována redukce žlučových kyselin na elektrodě ze skelného uhlíku modifikované vícečetnými uhlíkovými nanotrubicemi, v tomto případě byla pozorována katodická odezva v blízkosti potenciálu -650 mV [26]. V této studii nebyla pozice katodického signálu, píku, závislá na pH. Naopak výška signálu na pH závislá byla, se zvyšujícím se pH se zvyšoval i pík. Signál zde byl přičítán redukci karboxylové skupiny pomocí čtyř elektronů na odpovídající hydroxymethylovou sloučeninu.

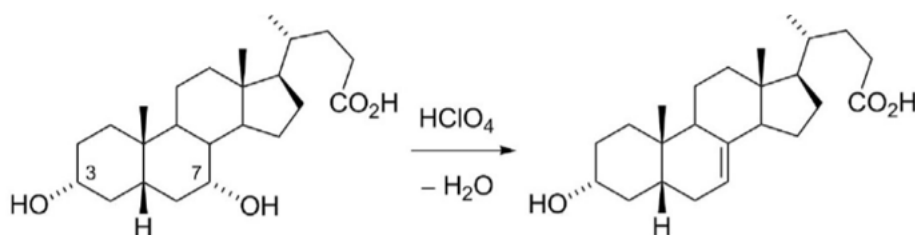
Na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy byly redukce žlučových kyselin studovány na visící rtuťové kapkové elektrodě [27–29], rtuťovým meniskem modifikované stříbrné amalgámové elektrodě [27,28,30], leštěné stříbrné amalgámové elektrodě [27].

Oxidace žlučových kyselin

Přímá elektrochemická oxidace žlučových kyselin na nemodifikovaných elektrodách byla dosud studována pouze v minimální míře. Díky nasycenému steroidnímu skeletu žlučových kyselin a absenci snadno oxidovatelných funkčních skupin nelze, za využití voltametrických technik, předpokládat jejich oxidaci ve vodných prostředích v rámci potenciálového okna běžných elektrodových materiálů.

Elektrochemické oxidaci na nemodifikovaných elektrodách se věnuje UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. V průkopnických experimentech provedených

touto skupinou byly popsány možnosti oxidace žlučových kyselin v nevodném prostředí acetonitril–chloristan sodný a směsném prostředí acetonitril–kyselina chloristá s minimálním obsahem vody (ca 0.55 %). Studium elektrochemického chování žlučových kyselin bylo prováděno voltametricky na elektrodě z vysoce orientovaného pyrolytického grafitu, elektrodě ze skelného uhlíku modifikované β -cyklodextrinem, borem dopované diamantové elektrodě a platinové elektrodě. V prostředí chloristanu sodného byl na borem dopované diamantové elektrodě pozorován špatně vyvinutý signál v oblasti vysoce kladných potenciálů ca +1,8 V. Při studiu oxidace žlučových kyselin v prostředí kyseliny chloristé poskytovaly cholová a chenodeoxycholová kyselina na borem dopované diamantové elektrodě dobře vyvinutou anodickou odezvu okolo +1,2 V [1,3]. Oxidace žlučových kyselin při tomto potenciálu je umožněna chemickou dehydratační reakcí, tzv. chemickou aktivací, která je zajištěna právě přítomností kyseliny chloristé ve studovaném roztoku (obr. 5). Tato chemická reakce probíhá ze studovaných látek v dostatečné míře pouze v případě primárních žlučových kyselin, které ve své struktuře obsahují 7α -hydroxylovou skupinu, tj. cholové kyseliny a chenodeoxycholové kyseliny. Přítomnost této skupiny je důležitá pro vznik elektrochemicky aktivního (nenasyceného) analogu těchto primárních žlučových kyselin, a tedy anodického voltametrického signálu. V následných studiích [31] bylo popsáno, že i jiné steroidy lze elektrochemicky oxidovat v přítomnosti acetonitrilu a kyseliny chloristé, popřípadě jiné silné dehydratující kyseliny. Mezi další studované steroidy patří například cholesterol (dvojná vazba na Δ^5) [32–34], 7-dehydrocholesterol (dvojná vazba na $\Delta^{5,7}$) [34–36] a vybrané fytosteroly (stigmasterol, β -sitosterol a ergosterol) [37,38].



Obr. 5 Schéma předpokládaného dehydratačního kroku při reakci chenodeoxycholové kyseliny s kyselinou chloristou. Upraveno z [1].

2.2 Analytické stanovení žlučových kyselin

Metody používané pro stanovení žlučových kyselin shrnul ve svém přehledném článku z roku 2019 Dutta *et al.*[39]. Pro stanovení žlučových kyselin bylo vyvinuto několik metod, které využívají různé přístupy pro separaci, detekci a kvantifikaci žlučových kyselin. Tyto metody zahrnují jednoduché, ale robustní techniky, jako jsou enzymatické testy, enzymatický imunosorbentový test (ELISA), chromatografii na tenké vrstvě (TLC). Dále různé analytické platformy využívající k detekci vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), plynové chromatografie (GC) a superkritické kapalinové chromatografie (SFC).

K těmto metodám přibyly metody zmiňované už výše, a to metody v kombinaci s hmotnostní detekcí (MS). Patří mezi ně plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC–MS), kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC–MS) nebo superkritická kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (SFC–MS). Tyto metody byly využity pro použití tzv. *high throughput* (automatizace experimentů, aby je bylo možné opakovat ve velkém měřítku). S molekulární charakterizací a detekcí žlučových kyselin pomáhá nukleární magnetická rezonance (NMR) [39]. Další možností stanovení je detekce elektrochemická, ta patří mezi doposud nepříliš prostudované metody [2].

2.2.1.1 Enzymatické metody

Enzymatické testy nabízejí relativně jednoduché a rychlé měření celkového obsahu žlučových kyselin, což z nich činí široce používané metody v klinických laboratořích. Nejjednodušší enzymatický test měří fluorescenci NADH generovanou 3 α -hydroxysteroid dehydrogenázou (3 α -HSD) a katalyzovanou oxidoredukční reakcí žlučových kyselin v přítomnosti NAD⁺ [40]. V poslední době byla vylepšena citlivá metoda pro odhad celkového obsahu žlučových kyselin v séru. Pro odhad celkového množství žlučových kyselin slouží redukce thio-NAD⁺ na thio-NADH, sledování průběhu této redukce je možné měřením změn absorbance, které proběhnou za jednu minutu času při 405/660 nm. Tato metoda je také známa jako metoda enzymatického cyklování a vykazuje detekční limit 0,22 μ M bez rušení bilirubinem, askorbáty, hemoglobinem nebo laktátdehydrogenázou [41]. Pro zlepšení účinnosti enzymatického stanovení celkového obsahu žlučových kyselin byla vyvinuta metoda nepřímé elektrochemické detekce s využitím sítotiskové uhlíkové elektrody. Tato metoda spotřebuje méně činidla, ale poskytuje podobnou detekční citlivost (až 5 μ M) jako metoda enzymatického cyklování [42]. Ačkoli enzymatické metody pro analýzu žlučových kyselin jsou v klinických laboratořích populární, identifikace jednotlivých žlučových kyselin je pomocí těchto metod značně omezena, je možné kvantifikovat pouze celkový obsah žlučových kyselin [39].

2.2.1.2 Chromatografické metody

Většina rutinních metod používaných v klinických laboratořích pro stanovení žlučových kyselin je založena na enzymatickém principu. Ty poskytují informace o celkovém obsahu žlučových kyselin, ale poskytují jen omezené informace o zastoupení jednotlivých žlučových kyselin. Jednotlivé žlučové kyseliny však mají rozdílný klinický význam, zejména pak hydrofobní sekundární žlučové kyseliny (lithocholová, deoxycholová kyselina). Zvýšené hladiny těchto kyselin jsou spojovány s rakovinou tlustého

střeva, cholestázou a tvorbou žlučových kamenů [43]. Z tohoto důvodu je v některých případech nezbytné použít selektivní techniky pro kvantifikaci specifických žlučových kyselin v klinické praxi. Chromatografické techniky závisí na selektivní afinitě migrujících složek ve stacionární a mobilní fázi, čímž dochází k oddělení jednotlivých žlučových kyselin od komplexní biologické matrice [44]. Volba chromatografického systému závisí na typu analyzovaných žlučových kyselin a také na typu molekul přítomných v interferující biologické matrici [39].

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) jsou používány pro rutinní kvalitativní analýzu primárních a sekundárních žlučových kyselin a jejich konjugátů s glycinem a taurinem pro její relativně jednoduchý a levný postup [44]. Existuje několik metod pro separaci chenodeoxycholové a deoxycholové kyseliny a jejich konjugátů, používají se buď TLC destičky se silikagelem (normální fáze TLC) nebo TLC destičky se silikagelem s navázanými alkylovými řetězci (reverzní fáze TLC), jejich rozlišení ale zůstává při vyšší koncentraci vzorku špatné. Zlepšení rozlišení bylo dosaženo použitím dvourozměrné TLC separace, kde byly umístěny dva různé systémy rozpouštědel s různými selektivitami. Ty byly použity k separaci cholové, chenodeoxycholové, deoxycholové, glykocholové, lithocholové, glykodeoxycholové a glykolitocholové kyseliny.[45] Separace izomerních dihydroxykonjugátů včetně glykochenodeoxycholové, taurodeoxycholové a taurocholové kyseliny je při požití TLC velmi špatná. Dolwy *et al.* použili TLC pro kvantitativní odhad žlučových kyselin za použití denzitometrie v UV oblasti (360 nm). Tímto způsobem byli schopni separovat a kvantifikovat pět žlučových kyselin (cholovou, deoxycholovou, chenodeoxycholovou, lithocholovou a ursodeoxycholovou), mez detekce byla v rozmezí 0,119–2,085 μg na skvrnu [46].

Vysokoúčinná kapalinná chromatografie (HPLC) je nejpoužívanější chromatografickou metodou pro analýzu žlučových kyselin. Tato technika nabízí mnohem lepší citlivost a separaci analytů v komplexní matrici ve srovnání s technikami diskutovanými výše. Modifikace chromatografie a výběr použitých detektorů a kolon v HPLC závisí na typu vzorku a účelu

analýzy. Pro vzorky s vysokou koncentrací žlučových kyselin (mmol l^{-1}) se používá HPLC ve spojení s RI (index lomu) nebo UV detektory. Pro vzorky s nízkou koncentrací žlučových kyselin (nmol l^{-1}) nebo nekonjugované žlučové kyseliny se špatnou absorpční schopností se často používá derivatizace před kolonou. Využívá se esterifikace derivatizačními činidly jako je například 4-brommethyl-7-methoxykumarin a 1-bromoacetylpyren nebo enzymatické reakce na koloně imobilizované 3 α -HSD využívající kolonu ze silikagelu s oktadecylovými zbytky, ty nabízejí výrazně zvýšenou citlivost a rozlišení žlučových kyselin, které jsou dále detekovány buď UV nebo fluorescenčním detektorem [44]. Poslední dobou se k derivatizaci jako činidlo používá nitrofenacylbromid, detekce žlučových kyselin je pak možná při vlnové délce 263 nm [47]. Tato metoda byla shledána jako vhodná pro separaci a detekci cholové, chenodeoxycholové, deoxycholové a hyodeoxycholové kyseliny s mezí detekce 14–15,5 ng ml^{-1} [48,49].

Plynová chromatografie (GC) je separační technika těkavých látek nebo polotěkavých složek v plynné fázi. Žlučové kyseliny obsahují karboxylové, hydroxylové a keto skupiny, ty zvyšují jejich schopnost vytvářet vodíkové vazby se sloučeninami, které často vedou k nízké těkavosti a k relativní tepelné stabilitě. Ve svém nativním stavu nejsou žlučové kyseliny dostatečně nestabilní pro přímou GC analýzu. Před nástřikem je nutné provést jejich derivatizaci. Derivatizací je dosaženo toho, že se žlučové kyseliny stanou dostatečně nestabilní pro GC analýzu [39]. Nejstarší aplikace GC pro analýzu řady žlučových kyselin byla popsána v roce 1960 pouze s čtyřmi methyl deriváty žlučových kyselin [50]. S rozvojem detekčních technik byla možná aplikace GC pro analýzu žlučových kyselin v žluči, séru, moči a výkalech za použití detektoru elektronového záchytu (ECD) a plamenoionizačního detektoru (FID) [44,51]. GC spojená s hmotnostní detekcí (GC-MS) je robustní a jednoduchá metoda, která je široce používána pro separaci a kvantifikaci žlučových kyselin [52]. Na rozdíl od použití FID nebo ECD je spojení s MS poměrně citlivé a vede k identifikaci žlučových kyselin na základě charakteristických vzorců MS fragmentace

za použití referenčních standardů. V roce 2007 byly vyvinuty metody GC–MS, které slouží k identifikaci žlučových kyselin v biologických vzorcích. Avšak tyto metody vyžadují velké objemy vzorků (5 ml a více) [53–55] a mnoho kroků, které předchází analýze jako jsou čistící kroky, které odstraňují z biologické matrice možné interference. Kumar *et al.* popsal relativně jednoduchou metodu GC–MS pro detekci sedmi žlučových kyselin: cholové, lithocholové, deoxycholové, chenodeoxycholové, ursodeoxycholové, α -muricholové a β -muricholové [56]. Jedním z kroků byla extrakce kapalina–kapalina pomocí methyl–t–buthyletheru, který sloužil jako derivatizační činidlo. Jako extrakční směs byl použit roztok N–methyl–N–(trimethylsilyl)trifluoroacetamid : jodid amonný : dithioerythritol. V GC–MS byl použit ionizační režim elektronového nárazu pro identifikaci žlučových kyselin a všechny ionty byly monitorovány ve zvoleném režimu (selected ion monitoring mode) [56].

2.2.1.3 Nukleární magnetická rezonance

Pro charakterizaci složení biologických vzorků bývá využívána nukleární magnetická rezonance (NMR) s vysokým rozlišením. Nukleární magnetická rezonance je vysoce reprodukovatelná metoda, která vyžaduje minimální přípravu vzorku, vyhýbá se tedy oproti předchozím metodám krokům extrakce a derivatizace. NMR byla využita jako nejspolehlivější a nejjednodušší metoda pro identifikaci a kvantifikaci žlučových kyselin. Protonovou NMR spektroskopií byla studována molekulární konformace sedmi různých solí žlučových kyselin v micelách [57].

Duarte *et al.* publikoval metodu pro analýzu celé jaterní tkáně s použitím 800 MHz ^1H -NMR spekter. Bylo možné přiřadit více než čtyřicet sloučenin včetně aminokyselin, organických kyselin, polyolů a také třech hlavních žlučových kyselin (cholová, deoxycholová a chenodeoxycholová kyselina) [58].

Navzdory skutečnosti, že NMR je nejspolehlivější metodou pro kvantitativní analýzu a prakticky nevyžaduje žádnou přípravu vzorku, tato

metoda má jen omezené použití v analýze žlučových kyselin kvůli relativně nízké citlivosti ve srovnání s metodami založenými na detekci pomocí hmotnostního spektrometru [39].

2.2.1.4 Elektrochemické metody

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1.5, žlučové kyseliny nepatří mezi látky, které by vykazovaly výraznou elektrochemickou aktivitu. I přes to vzniklo několik studií, které se věnují jejich analytickému stanovení za využití elektrochemické detekce.

První zde zmíněná studie se zabývala propojením HPLC a pulsní amperometrické detekce a možností separace a následné detekce žlučových kyselin v jejich směsi. V pulsním amperometrickém detektoru byla jako pracovní elektroda použita zlatá elektroda. Použity byly tři pulsy o hodnotách $E_1 = +0,03$ V, $E_2 = +0,60$ V a $E_3 = -0,80$ V) Žlučové kyseliny byly ze směsi separovány použitím HPLC s reverzní fází (RP-HPLC). Pulsní amperometrická detekce látek, které obsahují hydroxylové skupiny vyžaduje hodnotu pH roztoku *ca* 13, proto byla použita RP-HPLC. Jejich retence se řídila počtem hydroxylových skupin v molekule (s vyšším počtem hydroxylových skupin klesala doba retence). Tímto přístupem je možné provést detekci jak konjugovaných, tak nekonjugovaných žlučových kyselin s podobnou citlivostí. Limit detekce byl $0,6 \mu\text{mol l}^{-1}$ [59]. V podobné studii byla jako pracovní elektroda v pulsním detektoru použita taktéž zlatá elektroda [60]. V této studii byly použity jiné tři pulsy a to $E_1 = +0,05$ V, $E_2 = +0,60$ V a $E_3 = -0,60$ V. Limit detekce této metody byl $10 \mu\text{mol l}^{-1}$. Pro separaci byla použita iontoměničová kolona pro výměnu aniontů s hydrofobním charakterem. Pořadí eluce je podobné jako v předchozím případě, nejdříve jsou eluovány žlučové kyseliny, které obsahují více hydroxylových skupin. Oproti RP-HPLC jsou v tomto případě konjugáty s glycinem eluovány před nekonjugovanými žlučovými kyselinami. Důvodem je vyšší hydrofilita žlučových kyselin konjugovaných s glycinem než nekonjugovaných žlučových kyselin. Protože v těchto

dvou studiích byla použita jako pracovní zlatá elektroda bylo možné pozorovat přímo oxidaci žlučových kyselin bez použití dalších činidel. V případě borem dopované diamantové elektrody je nutné použít dehydratační činidlo, aby došlo k tvorbě dvojné vazby na steroidním jádře a bylo umožněno sledování oxidační odezvy [1]. Nevýhodou těchto studií [59,60] byla nutnost vysokého pH roztoku *ca* 13.

Třetí studie je zaměřena na stanovení ursodeoxycholové kyseliny a přítomných nečistot ve farmaceutických preparátech [61]. V tomto případě byla propojena HPLC s UV detekcí a elektrochemickým detektorem (ED), který byl tvořen coulometickou analytickou celou, která obsahovala dvě grafitové porézní elektrody v in-line zapojení pracujících při +0,60 V a +1,40 V. Následně jsou zde porovnána data získaná UV detekcí s daty získanými elektrochemickou detekcí. V této práci však nejsou přítomny žádné voltamogramy ani žádné další informace, které by napovídaly, jaké elektrochemické procesy probíhaly.

V práci Kloudy *et al.* [2] byla využita již popsaná metoda chemické aktivace žlučových kyselin pro analytické účely [1]. V tomto případě je za pomoci dehydratační reakce umožněna přímá detekce cholové a chenodeoxycholové kyseliny po jejich extrakci na pevné fázi z umělého séra. Limity detekce v DPV byly určeny následující: 0,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro cholovou kyselinu a 1,0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro chenodeoxycholovou kyselinu s lineární koncentrační závislostí minimálně do 80 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

3 Experimentální část

3.1 Studované látky a použité chemikálie

Studované žlučové kyseliny byly cholová kyselina, chenodeoxycholová kyselina a α -muricholová kyselina od firmy Sigma–Aldrich, jejich (deklarovaná minimální čistota 95 %). Zásobní roztok kyseliny cholové v acetonitrilu byl připraven o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Zásobní roztoky α -muricholové a chenodeoxycholové kyseliny v acetonitrilu byly připraveny o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. Zásobní roztok cholové kyseliny byl připraven o nižší koncentraci z důvodu menší rozpustnosti kyseliny v acetonitrilu.

Další použité chemikálie byly acetonitril pro HPLC od Sigma–Aldrich, kyselina chloristá 70% od Lach–Ner (Neratovice, ČR), bezvodý chloristan sodný od výrobce Fluka a alumina od firmy Elektrochemické detektory (Turnov, ČR). Všechny chemikálie byly analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

3.2 Metody měření

Pro měření metodou cyklické voltametrie byl používán potenciostat Autolab (software Nova 1.1/2.0/2.1.3).

Pracovní borem dopovaná diamantová elektroda o průměru 3 mm ($A_{\text{geom}} = 7,1 \text{ mm}^2$) byla od Windsor Scientific (Slough, Velká Británie). Elektroda je tvořena BDD diskem umístěným v těle, které je z materiálu PEEK (polyetherketonový polymer vznikající alkylací bisfenolových solí). Samotná elektroda byla před každým měřením leštěna pomocí suspenze aluminy o velikosti částic $0,5 \mu\text{m}$ (Elektrochemické detektory, Turnov) v destilované vodě po dobu 15 s.

Jako referenční elektroda je používán stříbrný drátek v roztoku $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3$ v $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$ v acetonitrilu (Pleskovova nevodná elektroda). Prostředí elektrody je od měřeného roztoku odděleno fritou. Pomocnou elektrodou je elektroda platinová. Objem měřeného roztoku byl 2 ml.

Při měření cyklickou voltametrií byla zvolena rychlost polarizace $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

3.3 Pracovní postup a zpracování dat

Jako základní elektrolyt byl použit roztok $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HClO}_4$ v acetonitrilu. Měřené roztoky žlučových kyselin byly připraveny o koncentracích:

$$\text{CA: } 9 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$$

$$\text{CDCA: } 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$$

$$\alpha\text{-MCA: } 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$$

Nejprve byl vždy proměřen základní elektrolyt a poté roztoky žlučových kyselin. Byly měřeny tři cykly, kdy pro zanesení výsledků do grafu byl použit vždy první cyklus.

Vyhodnocení získaných křivek proběhlo odečtením hodnoty signálu základního elektrolytu při určitém potenciálu od hodnoty signálu žlučových kyselin při stejném potenciálu. Tvorba grafů poté proběhla v softwaru OriginPro 2016 od firmy OriginLab Corporation (Northampton, MA, USA).

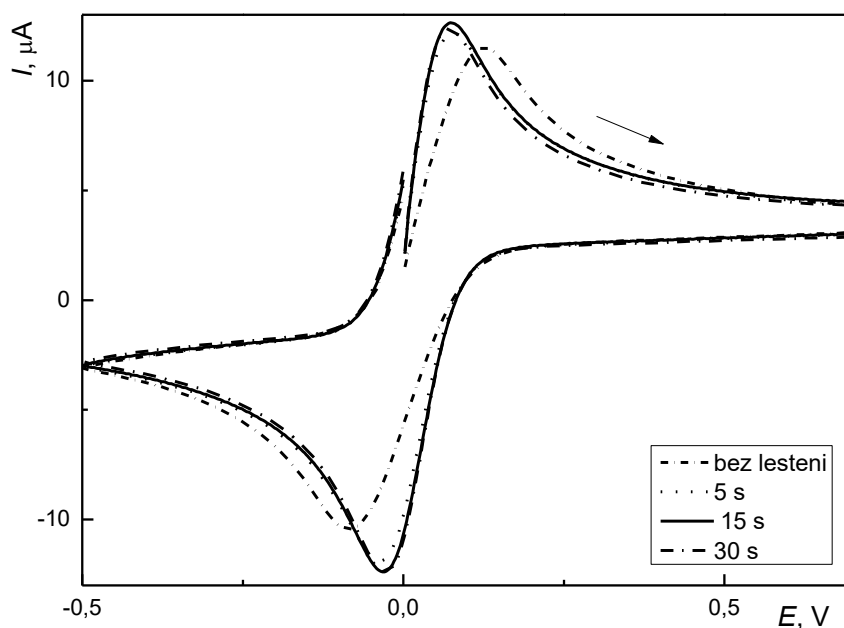
4 Výsledky a diskuze

V této kapitole jsou shrnuty a diskutovány výsledky studia elektrochemického chování, konkrétně redukce, vybraných žlučových kyselin: cholové, chenodeoxycholové a α -muricholové kyseliny v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé, která tvořila základní elektrolyt. Všechna elektrochemická měření probíhala na BDD elektrodě. Dále byl studován vliv vloženého počátečního potenciálu na vývoj píku vybraných žlučových kyselin. Stabilita odezvy žlučových kyselin byla studována v závislosti na čase uplynulém od přípravy odpovídajících roztoků po měření a na teplotě a času zahřívání roztoků.

4.1 Charakterizace BDD elektrody

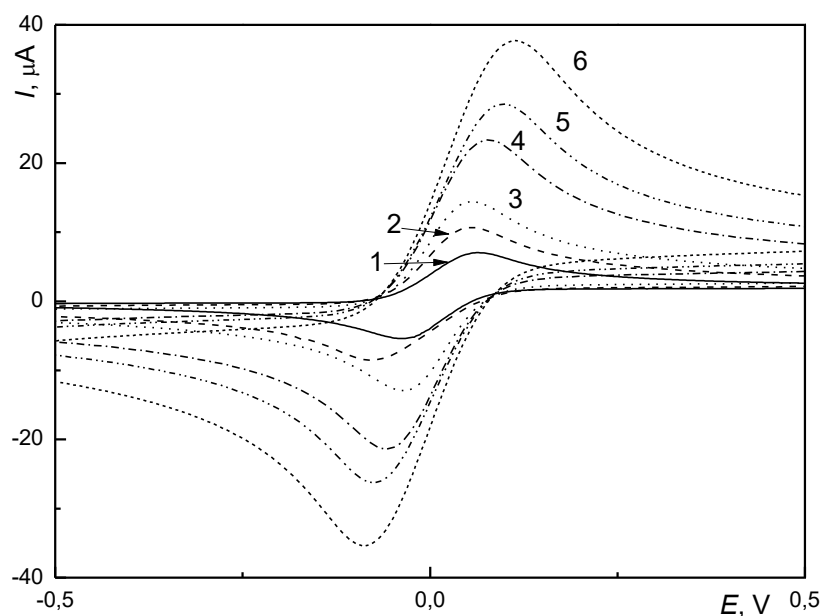
Charakterizace BDD elektrody byla provedena pomocí roztoku hexakyno-železnatanu draselného ($K_4[Fe(CN)_6]$), který je také nazýván jako ferrokyanid draselný. Tato látka poskytuje odezvu v oblasti anodických i katodických proudů.

Nejprve bylo nutné určit čas, po který je nutno elektrodu leštit, aby byly signály reprodukovatelné. Roztok byl proměřen nejprve bez leštění elektrody a následně po leštění elektrody suspenzí aluminou po dobu 5 s, 15 s a 30 s. Jak je patrné z obrázku 6, po 15 s leštění se odezva ferrokyanidu draselného ustálila. Před každým dalším měřením tak byla BDD elektroda leštěna aluminou po dobu 15 s.



Obr. 6 Cyklické voltamogramy $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) v 1 mol l^{-1} chloristanu draselném. Zaznamenány byly bez leštění a následně po tom, co byla BDD elektroda leštěna 5 s, 15 s a 30 s. Rychlost polarizace $0,1 \text{ V s}^{-1}$, měřeno v rozmezí od $-0,5 \text{ V}$ do $+1,0 \text{ V}$.

Roztok $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ byl proměřen cyklickou voltametří při různých rychlostech polarizace. Z naměřených cyklických voltamogramů (obr. 7) byly získány informace o reverzibilitě děje probíhajícího na pracovní elektrodě (tabulka 3). Reverzibilitu děje je možné posuzovat z poměru mezi anodickým a katodickým proudem (I_A/I_K), ten by měl být teoreticky roven jedné. Další hodnotou vypovídající o reverzibilitě děje je rozdíl potenciálů E_A a E_K mezi vrcholy píků v anodické a katodické oblasti. Teoretická hodnota rozdílu těchto potenciálů je rovna $0,059 \text{ V}$, což odpovídá reverzibilnímu systému, který předává jeden elektron. Ze získaných hodnot bylo zjištěno, že děj probíhající na BDD elektrodě lze označit jako děj quasireverzibilní. Byly zjištěny odchylky v hodnotách I_A/I_K a hodnota ΔE nebyla rovna $0,059 \text{ V}$.



Obr. 7 Cyklické voltamogramy ferrokyanidu draselného o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ v 1 mol l^{-1} chloristanu draselném pro rychlosti polarizace: (1) 0,020, (2) 0,050, (3) 0,100, (4) 0,300, (5) 0,500 a (6) 1,000 V s^{-1} .

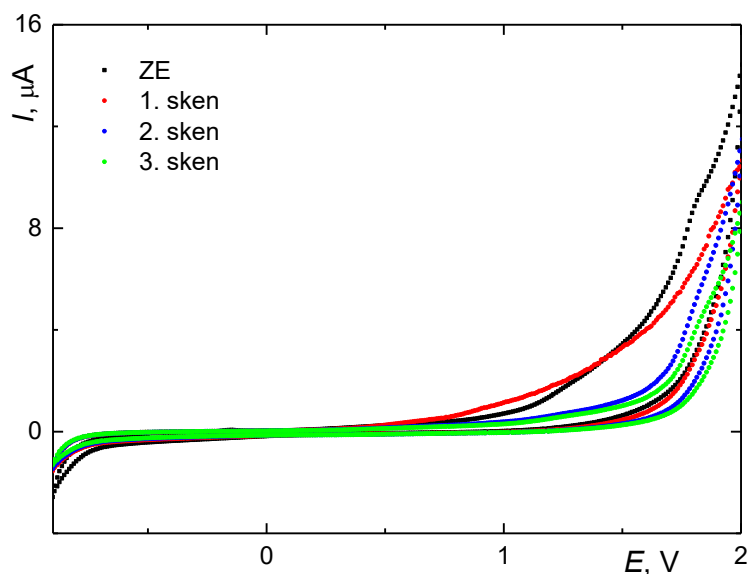
Tab. 3 Absolutní hodnoty podílu anodického a katodického proudu ($|I_A/I_K|$) a rozdíly hodnot potenciálu (ΔE) pro anodický a katodický pík ferrokyanid draselný o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ v 1 mol l^{-1} chloristanu draselném pro různé rychlosti polarizace.

Rychlost polarizace, V s^{-1}	$ I_A/I_K $	$\Delta E, \text{V}$
0,020	1,03	0,104
0,050	0,90	0,122
0,100	1,11	0,088
0,300	1,02	0,131
0,500	1,02	0,158
1,000	1,05	0,202

4.2 Vliv základního elektrolytu na voltametrickou odezvu žlučových kyselin

Studiu elektrochemických vlastností cholové a chenodeoxycholové kyseliny se již ve své práci zabýval Klouda [1,2]. Tyto žlučové kyseliny byly studovány v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé při minimálním obsahu vody 0,4 %. Při těchto podmínkách poskytovaly obě žlučové kyseliny anodický signál u ca +1,2 V vs. Ag/AgNO₃, což je v souladu s již publikovanými daty v literatuře [1,2]. V této práci byla nově studiu elektrochemických vlastností podrobena α -muricholová kyselina. Ta ve své struktuře obsahuje, stejně jako již zmíněné primární žlučové kyseliny 7 α hydroxylovou skupinu, která byla identifikována jako klíčová pro zajištění anodického signálu u +1,2 V. Klouda se ve svých pracích zaměřoval na chování žlučových kyselin v oblastech kladného potenciálu, tato práce jeho studii rozšiřuje o elektrochemické chování žlučových kyselin v oblasti potenciálů záporných.

Nejprve bylo studováno chování α -muricholové kyseliny v bezvodém prostředí acetonitrilu a chloristanu sodného jako základního elektrolytu. Je známo, že některé žlučové kyseliny za těchto podmínek podléhají přímé oxidaci v oblasti vysoce pozitivních potenciálů. Klouda ve své práci prezentuje výsledky dosažené při studiu cholové a chenodeoxycholové kyseliny v prostředí acetonitrilu a chloristanu sodného [3]. Tyto kyseliny je možné při vysokých pozitivních potenciálech oxidovat, ale jejich odezvu není možné dobře kvantifikovat. Bylo tedy nutné popsat elektrochemickou aktivitu v prostředí acetonitril/chloristan sodný i pro kyselinu α -muricholovou, která nebyla předmětem studia práce [3]. Na obrázku 8 jsou zaznamenány cyklické voltamogramy v celém potenciálovém okně BDD elektrody. Je vidět, že α -muricholová kyselina neposkytuje vyhodnotitelnou oxidační ani redukční odezvu ve zpětném skenu, toto prostředí tedy není pro detekci α -muricholové kyseliny vhodné.

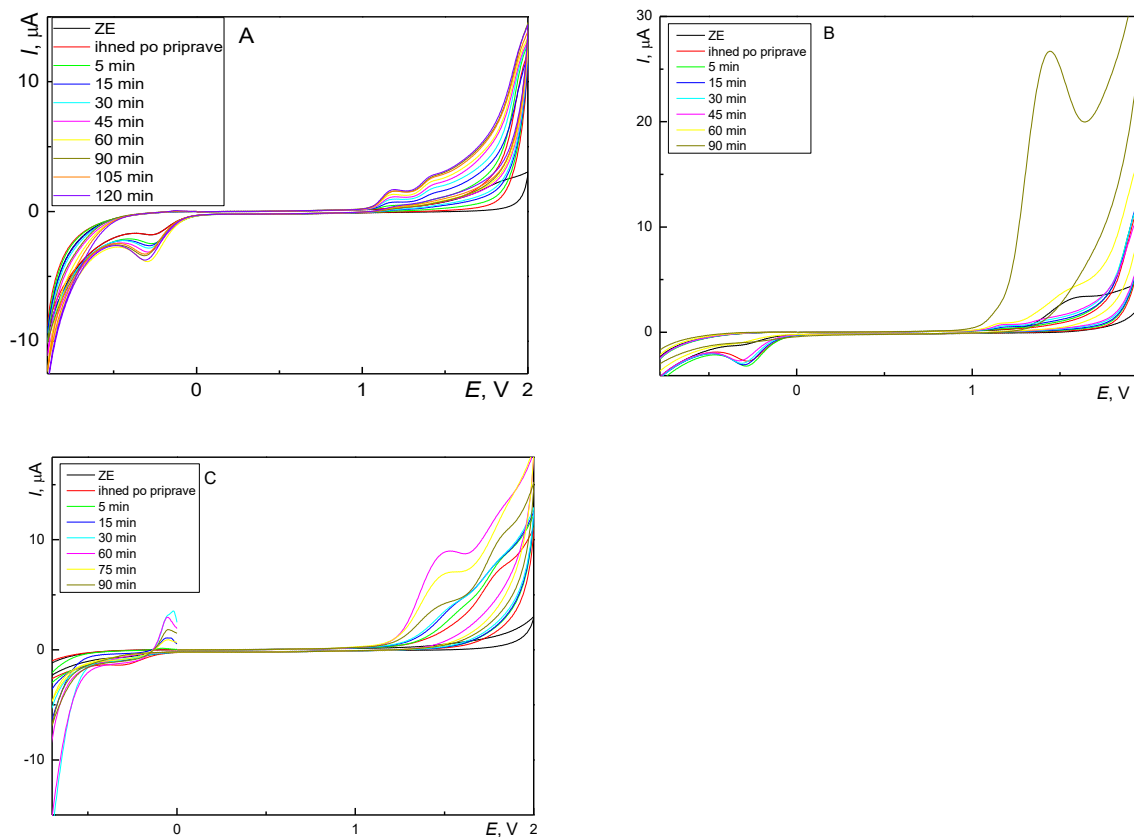


Obr. 8 Cyklické voltamogramy α -muricholové kyseliny ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$ v acetonitrilu. Rychlost polarizace elektrody $0,1 \text{ V s}^{-1}$, měřeno v rozsahu $-0,9 \text{ V}$ až $+2,0 \text{ V}$. Záznam třech po sobě jdoucích cyklů. Základní elektrolyt je znázorněn černou křivkou.

Dále bylo studováno chování všech tří studovaných žlučových kyselin v prostředí acetonitril - kyselina chloristá. Roztoky pro měření byly připraveny smísením zásobního roztoku příslušné žlučové kyseliny v acetonitrilu a $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu a byl vždy zaznamenán cyklický voltamogram těsně po smísení obou roztoků a dále byly zaznamenány cyklické voltamogramy v několika minutových intervalech do stabilizace odezvy. Obsah vody v měřeném roztoku je $0,55 \%$, jedná se o experimentálně zjištěnou hodnotu titrací podle Karla Fischera [2]. Měření byla prováděna v rozsahu potenciálového okna BDD elektrody od potenciálu $-0,9 \text{ V}$ do $+2,0 \text{ V}$. Při sledování vývoje signálu v čase bylo zjištěno, že dochází k nárůstu anodického signálu, charakteristického ná-

růstem proudu oproti voltamogramu základního elektrolytu od potenciálu +1,0 V do +1,7 V, což je v souladu s údaji z literatury [1]. Tato časová závislost je dána chemickou reakcí, dehydratací zahrnující 7 α hydroxylovou skupinu a vodík na C⁸, která vede k zavedení dvojně vazby do molekuly žlučové kyseliny a aktivuje ji pro elektrochemickou oxidaci [1]. Podle aktuálních dat, která byla získána pomocí NMR spektroskopie, se zdá, že po eliminaci 7 α hydroxylové skupiny a přesunu atomů vodíků vznikne směs produktů s nenasyceným C nebo D kruhem steroidního jádra. Následující elektrochemickou oxidací vzniká směs ketonických a diketonických produktů [2].

Kromě vývoje signálu v oblasti pozitivních potenciálů dochází u všech kyselin také k vývoji katodického signálu v oblasti negativních potenciálů. Tyto katodické signály se jeví dobře odlišitelné (jak je patrné z obrázku 9) od voltamogramu základního elektrolytu. V literatuře nebyly dosud popsány, a tak byla dále věnována pozornost podmínkám jejich vzniku a možnostem jejich analytického využití.



Obr. 9 Cyklické voltamogramy A) chenodeoxycholové kyseliny ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$), B) cholové kyseliny, ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) a C) α -muricholové kyseliny ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HClO}_4$ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,55 %. Rychlost polarizace elektrody $0,1 \text{ V s}^{-1}$, měřeno v rozsahu $-0,9 \text{ V}$ až $+2,0 \text{ V}$. Voltamogramy zaznamenány ihned po přípravě smísením roztoku jednotlivých žlučových kyselin v acetonitrilu s roztokem HClO_4 (0 min.) a následně v dalších uvedených časových intervalech. Základní elektrolyt je znázorněn černou křivkou.

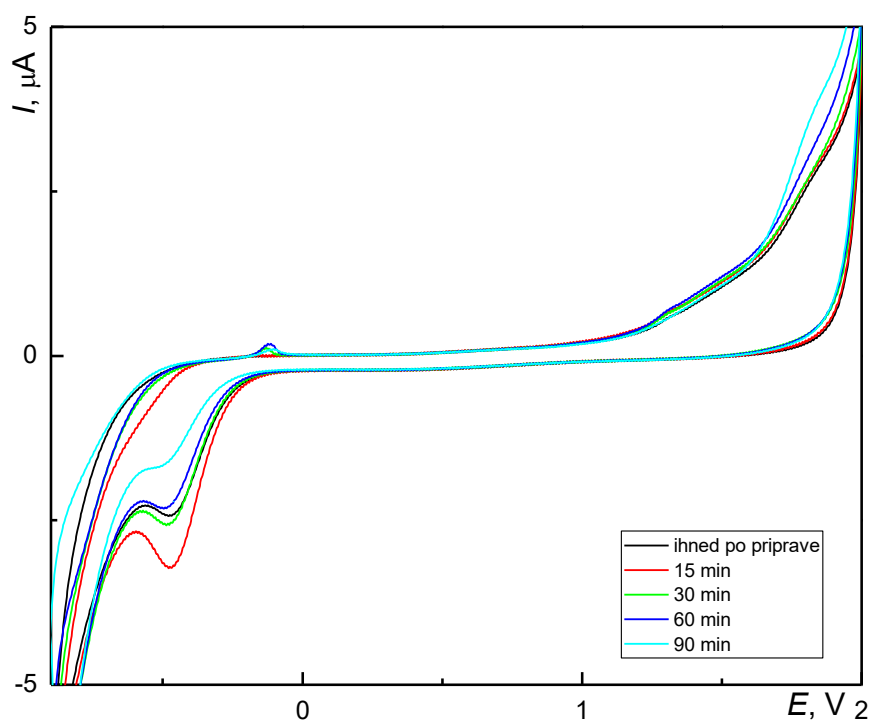
4.3 Studium podmínek pro detekci žlučových kyselin v oblasti záporných potenciálů

Během studia vývoje signálu žlučových kyselin v čase byl pozorován vývoj signálu v oblasti záporných potenciálů. Tento signál byl pozorován pouze v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé. V následných experimentech byly identifikovány podmínky, za kterých se tato odezva vyvíjí. Nejprve bylo provedeno měření katodického skenu od 0 V do $-0,9$ V. Jako další byla studována možnost interference mezi katodickou odezvou žlučových kyselin a signálem kyslíku, a to z tohoto důvodu, že se tyto dvě odezvy nacházejí ve své blízkosti. Následně byly identifikovány specifické podmínky, které vedou ke vzniku signálu v oblasti záporných potenciálů. Nejprve bylo zjištěno, zda je k zisku odezvy nutná přítomnost kyslíku a dále bylo studováno, jakou hodnotu musí mít vkládaný pozitivní potenciál, aby bylo možné katodickou odezvu pozorovat.

Protože byl v oblasti záporných potenciálů pozorován nízký signál v cyklickém voltamogramu základního elektrolytu, bylo potřeba zjistit, zda v tomto rozsahu potenciálů nedochází s časem i k vývoji odezvy v základním elektrolytu a není tak zaměňován signál kyslíku s odezvou žlučových kyselin. Byla tedy studována katodická odezva kyslíku v roztoku za stejných podmínek, za kterých docházelo k vývoji katodického signálu žlučových kyselin (kap. 4.2). Roztok základního elektrolytu byl připraven smísením 1 mol l^{-1} kyseliny chloristé s acetonitrilem v poměru 1:9. Měření bylo provedeno metodou cyklické voltametrie v šíři potenciálového okna BDD elektrody od $-0,9$ V do $+2,0$ V ihned po přípravě a následně v časech 15 min, 30 min, 60 min a 90 min od přípravy. Zaznamenané voltamogramy jsou na obr. 10. Cyklické voltamogramy základního elektrolytu se v čase prakticky nemění, s výjimkou dobře patrného signálu kyslíku při potenciálu $-0,45$ V. Největší nárůst jeho odezvy byl do 15 minut od přípravy roztoku, poté se signál stabilizoval, aby po 90 minutách

jeho hodnota klesla přibližně na 30 % intenzity pozorované ihned po přípravě roztoku. To může být dáno tím, že při přípravě je v roztoku přítomno vyšší množství kyslíku, to během ustálení roztoku v čase klesá, a tak dochází k poklesu katodické odezvy kyslíku. Jak je patrné z naměřených voltamogramů, nedocházelo k významnému vývoji signálu kyslíku. V čistě vodných kyselých roztocích, nebyl pozorován na BDD elektrodách vývoj signálu kyslíku [62]. To, že v prostředí acetonitrilu je signál kyslíku možné pozorovat je zřejmě dáno rozpustností atmosférického kyslíku v acetonitrilu, ta je přibližně osmkrát vyšší než rozpustnost kyslíku ve vodě [63].

Porovnáním těchto měření a katodických signálu jednotlivých žlučových kyselin (obr. 9) lze s vysokou dávkou jistoty tvrdit, že v případě katodické odezvy žlučových kyselin obsahujících 7α hydroxylovou skupinu při potenciálech přibližně $-0,5$ V se nejedná o odezvu kyslíku rozpuštěného v základním elektrolytu, který by se vyvíjel v čase, ale jedná se o odezvu těchto žlučových kyselin.



Obr. 10 Cyklické voltamogramy základního elektrolytu ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyselina chloristá v acetonitrilu s obsahem vody $0,55 \%$) bez odstranění kyslíku z roztoku. Rychlost skenu $0,1 \text{ V s}^{-1}$, měřeno v rozsahu $-0,9 \text{ V}$ až $+2,0 \text{ V}$. Voltamogramy zaznamenaný ihned po přípravě roztoku základního elektrolytu a následně v dalších uvedených časových intervalech.

4.3.1 Chenodeoxycholová kyselina

Roztok chenodeoxycholové kyseliny byl připraven smísením chenodeoxycholové kyseliny o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, kyseliny chloristé o koncentraci 1 mol l^{-1} a acetonitrilu v poměru 1:1:8. Roztok byl měřen v rozsahu potenciálů od $-0,9 \text{ V}$ do $+2,0 \text{ V}$. Zaznamenané voltamogramy jsou

zobrazeny na obr. 9A. Na obr. 11A je prezentována závislost výšky anodického signálu při potenciálu +1,2 V a katodického při potenciálu ca -0,4 V. Z obrázku 9A a 11A vyplývá, že v oblasti od -0,2 V do -0,6 V dochází k vývoji signálu s maximem při -0,35 V, který je možné dobře rozlišit od linie základního elektrolytu. Tento signál není možné pozorovat ihned po přípravě roztoku, kdy je patrný pouze signál kyslíku při potenciálu -0,25 V. Oproti předešlému měření základního elektrolytu (obr. 10), zde došlo k posunu signálu kyslíku z -0,45 V do -0,25 V. Odezva se s časem vyvíjí. Do 60 minut od přípravy roztoku je možné pozorovat nárůst signálu jak v anodické, tak v katodické proudové oblasti. Poté signál mírně klesá a stabilizuje se.

Na základě předešlého měření bylo nutné zjistit, zda je pro vznik katodické odezvy nutná předchozí oxidace chenodeoxycholové kyseliny. Byl připraven roztok této žlučové kyseliny stejným způsobem, jako v předešlém případě. Odezva chenodeoxycholové kyseliny byla měřena po 60 minutách od přípravy, tj. po stabilizaci proudových signálů. Nejprve proběhlo pozorování katodické odezvy při měření v rozsahu potenciálů od -0,9 V do -0,3 V, tedy bez elektrochemické oxidace (+1,2 V). V tomto rozsahu potenciálů nebylo možné pozorovat žádnou odezvu chenodeoxycholové kyseliny. Poté byla studována tvorba odezvy v rozsahu potenciálů od -0,9 V do +1,27 V. Tento konečný potenciál byl zvolen, protože je při něm možné pozorovat konec vývoje odezvy první elektrochemické oxidace. Po proběhnutí elektrochemické oxidace pouze prvního signálu nebyla v katodické oblasti, stejně jako v předešlém případě, pozorována žádná odezva této žlučové kyseliny. Následně bylo měřeno v potenciálech od -0,9 V do +1,5 V, tj. konečný kladný potenciál cyklické voltametrie byl roven hodnotě potenciálu, při kterém byl dokončen elektrochemický děj pro druhý oxidační signál. Ani v tomto případě nebylo možné při zpětném skenu cyklického voltamogramu pozorovat katodickou odezvu. Nakonec byl roztok chenodeoxycholové kyseliny proměřen v potenciálech od

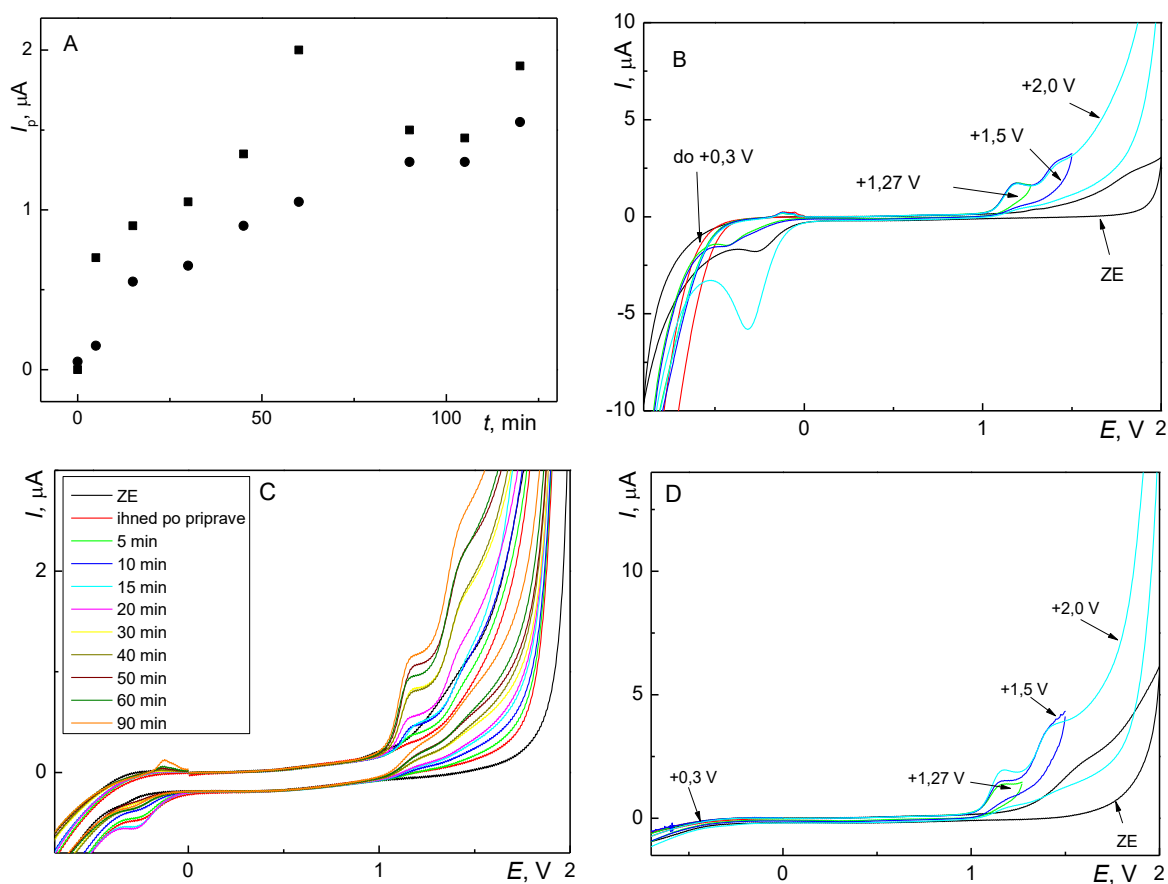
-0,9 V do +2,0 V. V tomto případě došlo k vývoji signálu v katodické oblasti, který bylo možné dobře rozlišit od odezvy základního elektrolytu. Z těchto získaných informací, viz obrázek 11B, vyplývá, že pro vývoj signálu chenodeoxycholové kyseliny při zpětném skenu cyklického voltamogramu je třeba, aby bylo dosaženo vysokého kladného potenciálu *ca* +2,0 V. Na BDD elektrodách v přítomnosti vody je toto způsobeno rozkladem vody na povrchu elektrody. K rozkladu dochází za použití vysoce kladných potenciálů (přibližně +2,0 V) a na povrchu BDD elektrody vznikají HO• radikály (rovnice 1).[64]



Následně byl studován vliv kyslíku, který je přirozeně rozpuštěn v roztoku v koncentraci přibližně 8,1 mmol l⁻¹ [63], na redukční signál chenodeoxycholové kyseliny. Měřený roztok byl připraven ve stejném poměru jako v předešlém případě. Bylo měřeno v širší potenciálového okna BDD elektrody od -0,9 V do +2,0 V a byla sledována katodická odezva v nepřítomnosti kyslíku. Ten byl odstraněn probubláním dusíkem po dobu 5 min a roztoky byly dále v průběhu měření drženy v atmosféře dusíku. Pro základní elektrolyt (1 mol l⁻¹ kyselina chloristá a acetonitril v poměru 1:9, obsah vody 0,55 %) a chenodeoxycholovou kyselinu jsou cyklické voltamogramy zaznamenané v čase ihned po přípravě a následně po 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min a 120 min na obr. 11C. Je viditelné, že v roztoku, který neobsahoval kyslík, došlo k vývoji signálu žlučové kyseliny jak v anodické, tak katodické oblasti. Bylo možné pozorovat nárůst signálu do 20 minut do přípravy roztoku, poté signál klesal až nebyla odezva rozlišitelný od linie základního elektrolytu. Vývoj signálu v katodické oblasti byl pozorovatelný, avšak oproti odezvě v roztoku za přítomnosti kyslíku minimální. Poté byla proměřena odezva v rozsahu potenciálů od -0,9 V do +0,3 V, od -0,9 V do +1,27 V, od -0,9 V do +1,5 V a od -0,9 V do +2,0 V. Získané křivky je možné vidět na

obrázku 11D. Výška signálu žlučové kyseliny v katodické oblasti při měření v nepřítomnosti kyslíku odpovídala 14 % výšky signálu, který byl pozorován v roztoku žlučové kyseliny za přítomnosti kyslíku.

Předběžné experimenty týkající se identifikace produktů oxidace ukazují, že finálními produkty by mohly být steroidy obsahující keto skupiny a chinoidní struktury. Tyto produkty vznikají při elektrolýze prováděné při potenciálu ukončení druhého anodického signálu. Při ukončení oxidace v oblasti vývoje $\text{OH}\cdot$ radikálu je zde předpokládána další hydroxylace steroidního skeletu žlučové kyseliny a případně oxidace na keto derivát. Vzhledem k nutnosti přítomnosti kyslíku pro výrazný vývoj katodického signálu lze předpokládat jeho katalytický účinek. Signál by mohl být způsoben podobným mechanismem jako je popsáno v článku Vacka *et al.* [65]. Ten ve své práci popisuje katalytickou redukci doxorubicinu, kdy je přítomný chinon redukován na hydrochinon. Vzniklý hydrochinon je kyslíkem přítomným v roztoku regenerován zpět na chinon. V případě žlučových kyselin by se mohlo jednat o redukci produktu oxidace žlučových kyselin na BDD elektrodě (například diketonu), který by byl zpětně oxidován přítomným kyslíkem na dihydroxy derivát. Navrhovaný mechanismus bude nutno potvrdit dalšími experimenty.



Obr. 11 A) Závislost výšky proudu katodického (■, pro $E_p = -0,4$ V) a anodického (●, pro $E_p = +1,2$ V) píku na době od přípravy roztoku pro chenodeoxycholovou kyselinu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹) v 0,1 mol l⁻¹ HClO₄ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,55 %. Rychlost skenu 0,1 V s⁻¹. Cyklické voltamogramy chenodeoxycholové kyseliny ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹) v 0,1 mol l⁻¹ HClO₄ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,55 %. Rychlost polarizace elektrody 0,1 V s⁻¹. B) Voltamogramy zaznamenaný 60 min. po přípravě. Měřeno v daných potenciálových oknech v přítomnosti kyslíku. C) Měřeno v rozsahu od -0,9 V do +2,0 V. Voltamogramy zaznamenaný ihned po přípravě smísením roztoku chenodeoxycholové kyseliny s roztokem HClO₄ a dále ve zmíněných ča-

sových intervalech. Měření proběhlo v nepřítomnosti kyslíku. D) Voltamogramy zaznamenány 60 min po přípravě. Měřeno v daných potenciálových oknech v nepřítomnosti kyslíku

4.3.2 Cholová kyselina

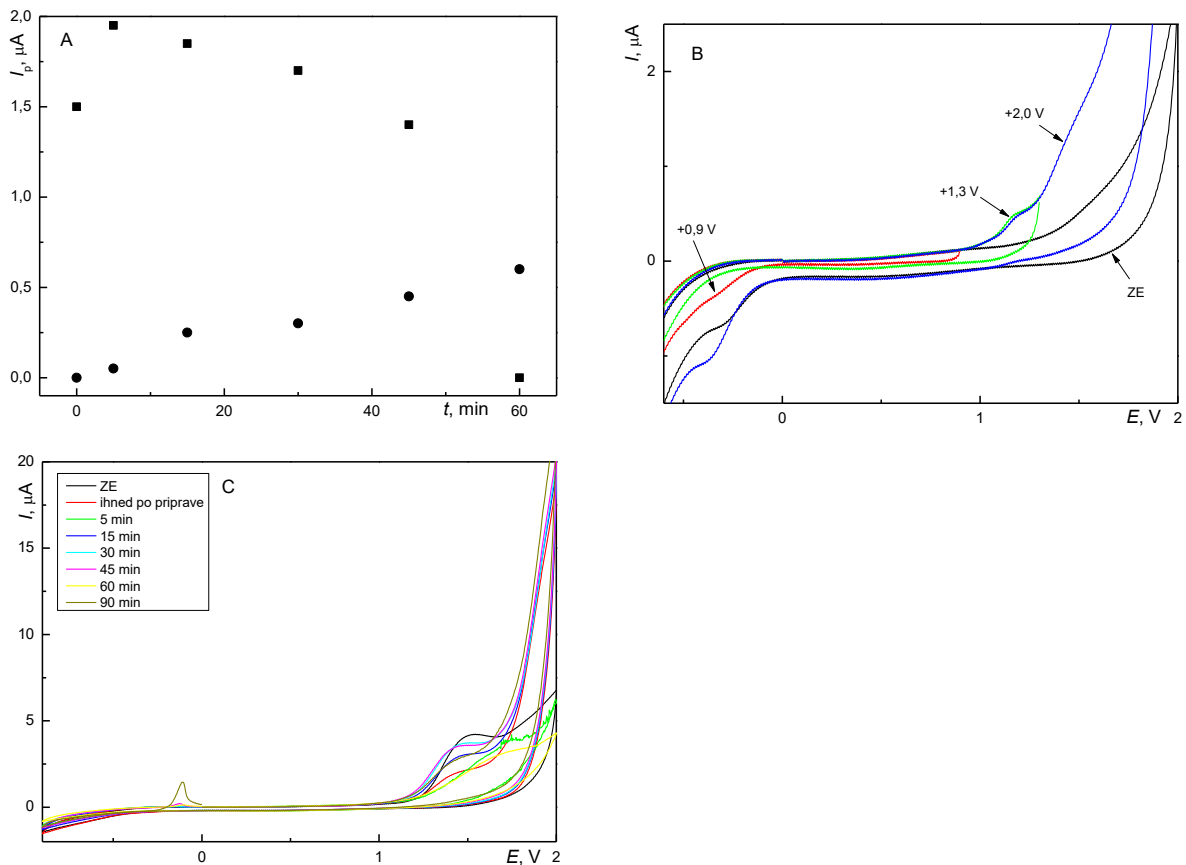
Měřený roztok byl připraven smísením cholové kyseliny o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, kyseliny chloristé o koncentraci 1 mol l^{-1} v poměru 9:1, aby koncentrace připraveného roztoku byla $9 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, tj. blížila se koncentraci roztoků obou dalších studovaných žlučových kyselin. Výchozí zásobní roztok cholové kyseliny je desetkrát méně koncentrovaný než zásobní roztoky α -muricholové a chenodeoxycholové kyseliny kvůli nižší rozpustnosti cholové kyseliny v acetonitrilu. Roztok základního elektrolytu byl připraven stejným způsobem jako v případě chenodeoxycholové kyseliny.

Na obrázku 12A je znázorněna závislost vývoje elektrochemické redoxní odezvy cholové kyseliny na čase v přítomnosti kyslíku v roztoku. Cholová kyselina poskytuje v oblasti anodických potenciálů jednu odezvu a to při +1,2 V. Tato odezva je pozorovatelná do 45 minut od přípravy roztoku, poté zřejmě dochází k transformaci kyseliny důsledkem dalších dehydratačních reakcí, protože po 60 minutách od přípravy je již odezva v anodické oblasti rozdílná. Dochází k nápadnému nárůstu anodického píku u +1,45 V (obr. 9). Cholová kyselina oproti chenodeoxycholové kyselině má navíc ve své struktuře hydroxylovou skupinu v poloze 12 α . Je tedy možné, že po 60 minutách od smísení roztoku dochází k dalším dehydratačním reakcím. Současně se změnami probíhajícími na steroidním jádru cholové kyseliny dochází k transformaci odezvy, která se projevuje právě nárůstem anodického píku u +1,45 V. V práci Kloudy *et al.* [2] byl porovnáván vývoj signálu při kladných potenciálech vlivem zahřívání. Docházelo k transformaci signálu a jeho posunu. Zatímco vlivem zahřívání docházelo k posunu odezvy k nižším potenciálům ca +0,6 V, bez zahřívání

po 60 minutách od přípravy roztoku došlo k posunu odezvy naopak na vyšší potenciál +1,45 V. V oblasti záporných potenciálů je možné pozorovat vývoj signálu při potenciálu -0,3 V. K největší odezvě dochází 5 minut od přípravy, následně jeho hodnota klesá s narůstajícím oxidačním signálem a po transformaci oxidačního signálu po 60 minutách není žádný redukční signál pozorovatelný. Zřejmě tak dojde změnami na steroidním jádře k zamezení průběhu oxidačních reakcí na BDD elektrodě, nedojde ke vzniku oxidačního produktu cholové kyseliny, který by byl následně redukován.

Následně byla, obdobně jako v případě chenodeoxycholové kyseliny, studována závislost přítomnosti odezvy v oblasti záporných potenciálů na hodnotě maxima vloženého kladného potenciálu. Cholová kyselina poskytuje pouze jednu odezvu v anodické oblasti, proto byly vybrány rozsahy od -0,9 V do +0,3 V (nedochází k oxidaci cholové kyseliny), od -0,9 V do +1,3 V (oblast oxidace cholové kyseliny) a od -0,9 V do +2,0 V (oblast úniku základního elektrolytu). Ze získaných informací v obrázku 12B je patrné, že k pozorování píku v katodické oblasti není nutná pouze oxidace žlučové kyseliny, ale i vložení vysokého potenciálu +2,0 V.

Protože předešlá měření probíhala v přítomnosti kyslíku, bylo nutné ověřit, jaký má na vývoj voltametrické odezvy při zpětném skenu vliv přítomnost kyslíku. Roztok základního elektrolytu i cholové kyseliny byl bublán dusíkem po dobu 5 minut před měřením a během měření nebyly roztoky bublány, ale byly drženy v atmosféře dusíku. Z naměřených cyklických voltamogramů v obrázku 12C vyplývá, že pokud není v roztoku přítomen kyslík, nelze pozorovat odezvu cholové kyseliny v katodické oblasti.



Obr. 12 A) Závislost výšky proudu katodického (■, pro $E_p = -0,3$ V) a anodického (●, pro $E_p = +1,2$ V) píku na době od přípravy roztoku pro cholovou kyselinu ($c = 9 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹) v 0,1 mol l⁻¹ HClO₄ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,55 %. Rychlost skenu 0,1 V s⁻¹. Cyklické voltamogramy cholové kyseliny ($c = 9 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹) v 0,1 mol l⁻¹ HClO₄ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,55 %. Rychlost skenu 0,1 V s⁻¹. B) Voltamogramy zaznamenány 30 min. po přípravě. Měřeno v daných potenciálových oknech. C) Měřeno v rozsahu od -0,9 V do +2,0 V. Voltamogramy zaznamenány ihned po přípravě smísením roztoku kyseliny cholové s roztokem HClO₄ a dále ve zmíněných časových intervalech v nepřítomnosti kyslíku.

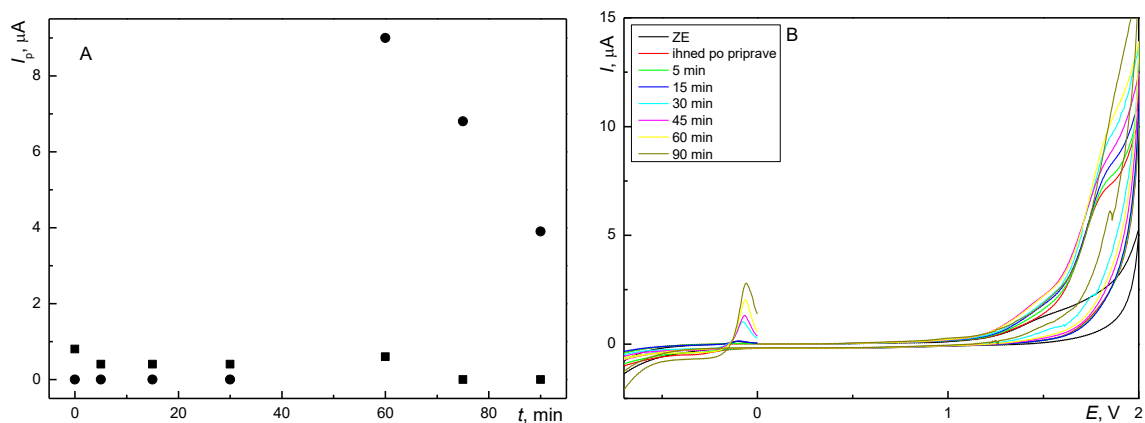
4.3.3 α -muricholová kyselina

Elektrochemické chování této primární žlučové kyseliny doposud nebylo studováno. Na základě přítomné 7 α hydroxylové skupiny bylo předpokládáno podobné chování jako u doposud studovaných primárních žlučových kyselin cholové kyseliny a chenodeoxycholové kyseliny. Měřený roztok byl připraven smísením α -muricholové kyseliny o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹, kyseliny chloristé o koncentraci 1 mol l⁻¹ a acetonitrilu v poměru 1:1:8, aby koncentrace připraveného roztoku byla $1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹. Roztok základního elektrolytu byl připraven stejným způsobem jako v případě chenodeoxycholové kyseliny.

Na obrázku 13A je znázorněna závislost vývoje elektrochemické redoxní odezvy α -muricholové kyseliny na čase v přítomnosti kyslíku v roztoku. α -muricholová kyselina poskytuje v oblasti anodických potenciálů dvě odezvy a to při -0,1 V a +1,5 V. První odezva narůstá do 30 minut od přípravy roztoku, druhá odezva narůstá do 60 minut od přípravy roztoku. Oxidační signál při +1,5 V je lépe vyvinutý za přítomnosti kyslíku, v nepřítomnosti kyslíku neposkytuje α -muricholová kyselina tento pik dobře definovaný (obr. 13B). U oxidačního signálu při -0,1 V dochází k jeho vývoji bez vlivu přítomnosti kyslíku, jedná se tedy zřejmě o oxidaci již vzniklých oxidačních produktů. α -muricholová kyselina ve své struktuře obsahuje oproti chenodeoxycholové kyselině navíc hydroxylovou skupinu v poloze 6 β , to může vést k jiným dehydratačním mechanismům, než probíhají u předešlých primárních žlučových kyselin. V oblasti záporných potenciálů v přítomnosti kyslíku je možné pozorovat vývoj signálu při potenciálu -0,35 V. Ihned po přípravě je signál dobře odlišitelný od linie základního elektrolytu a s postupem času odezva klesá až zcela zmizí. Pokud je z roztoku kyslík odstraněn, k vývoji redukčního signálu nedochází.

Následně byla obdobně jako v případě chenodeoxycholové a cholové kyseliny studována přítomnost odezvy v oblasti záporných potenciálů

v závislosti na hodnotě maxima vloženého kladného potenciálu. α -muricholová kyselina poskytuje odezvu v anodické oblasti, proto byly vybrány rozsahy od $-0,9$ V do $+1,0$ V (nedochází k oxidaci α -muricholové kyseliny), od $-0,9$ V do $+1,7$ V (oblast oxidace α -muricholové kyseliny) a od $-0,9$ V do $+2,0$ V (oblast úniku základního elektrolytu). Z naměřených cyklických voltamogramů je stejně jako u předcházejících dvou žlučových kyselin patrné, že k pozorování píku v oblasti záporných potenciálů není nutná pouze první oxidace žlučové kyseliny, ale i vložení vysoce kladného potenciálu $+2,0$ V. Stejně jako je tomu v případě předešlých primárních žlučových kyselin, je pro vývoj redukčního signálu důležitá přítomnost kyslíku v roztoku.

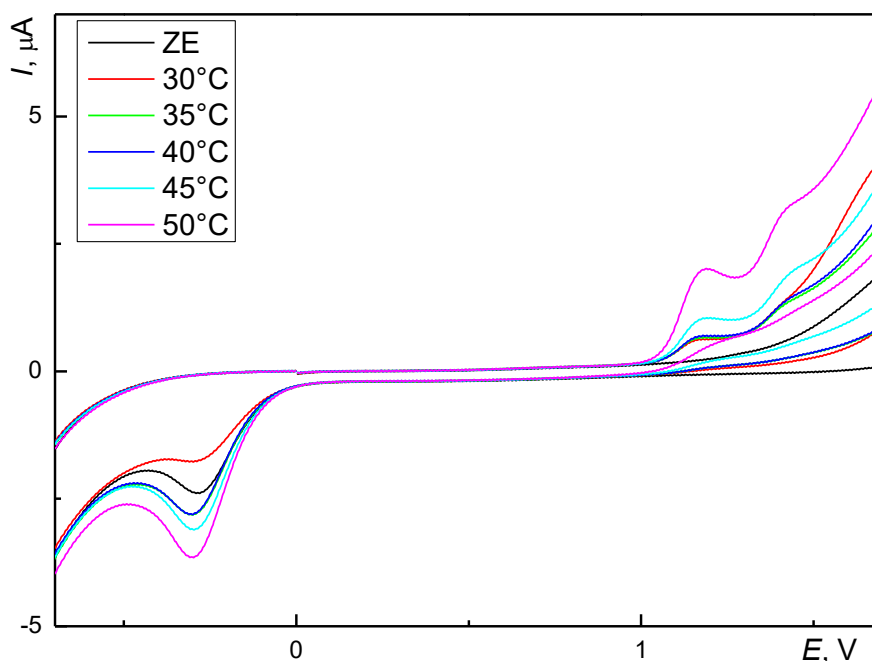


Obr. 13 A) Závislost výšky proudu katodického (■, pro $E_p = -0,35$ V) a anodického (●, pro $E_p = +1,5$ V) píku na době od přípravy roztoku pro α -muricholovou kyselinu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) v $0,1$ mol l^{-1} HClO_4 v prostředí acetonitrilu s obsahem vody $0,55$ %. Rychlost polarizace elektrody $0,1$ V s^{-1} . B) Cyklické voltamogramy kyseliny α -muricholové ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}) v $0,1$ mol l^{-1} HClO_4 v prostředí acetonitrilu s obsahem vody $0,55$ %. Rychlost skenu $0,1$ V s^{-1} . Měřeno v rozsahu od $-0,9$ V do $+2,0$ V. Voltamogramy zaznamenány ihned po přípravě směsí roztoku kyseliny α -muricholové s roztokem HClO_4 a dále ve zmíněných časových intervalech. Měření proběhlo v nepřítomnosti kyslíku.

4.4 Vliv podmínek zahřívání chenodeoxycholové kyseliny na tvorbu odezvy v oblasti záporných potenciálů

Jak již bylo zmíněno výše, je vývoj jak anodického, tak katodického signálu chenodeoxycholové kyseliny závislý na čase. K vývoji stabilního a dobře definovaného signálu dochází až po více jak 45 minutách od přípravy roztoku. Tento čas není pro provádění rutinních analýz vhodný, a tak bylo přistoupeno ke studiu možnostem urychlení vývoje odezvy. Anodický signál chenodeoxycholové kyseliny a cholové kyseliny u +1,2 V je stabilní po zahřívání roztoku na 50 °C po dobu 5 minut [2]. Při delším zahřívání (30 min) dochází u kyseliny cholové k transformaci její odezvy [2], stejně tak jako bylo pozorováno při časové závislosti na obr. 9B výše. Na základě těchto informací byla pro další studium odezvy při záporných potenciálech vybrána chenodeoxycholová kyselina, u které nedochází k transformaci odezvy.

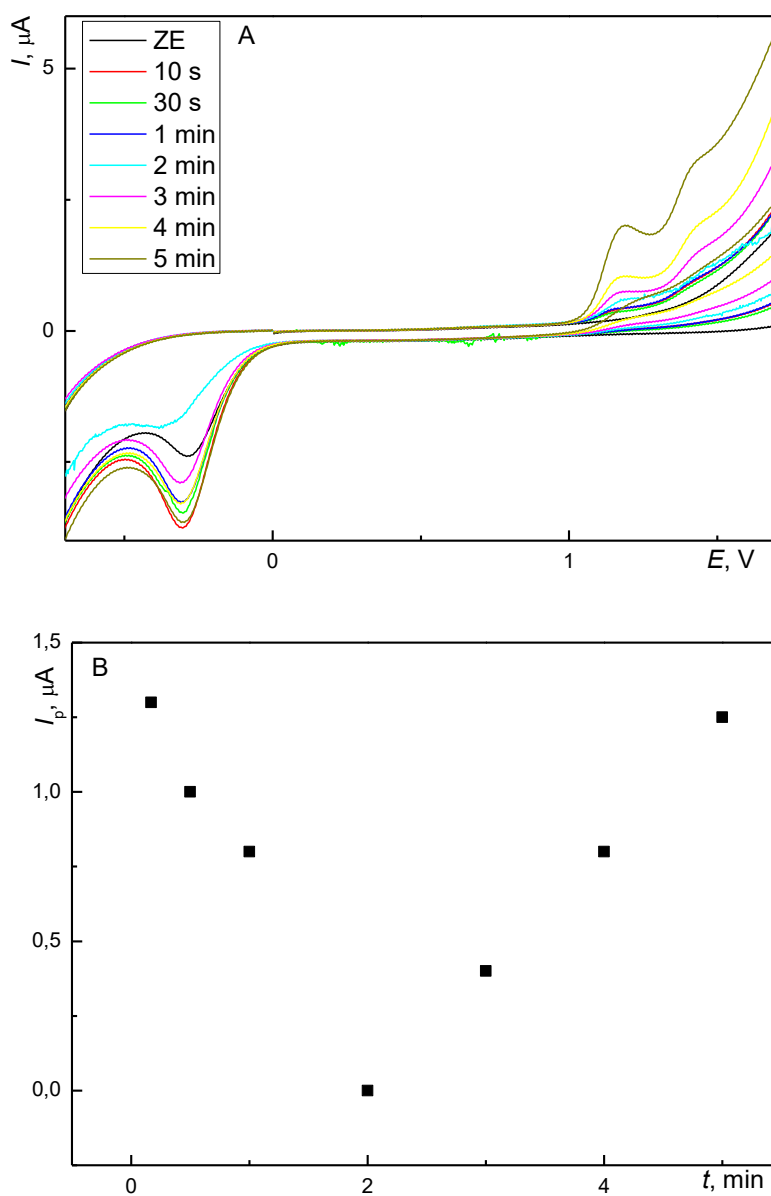
Měřený roztok chenodeoxycholové kyseliny byl připraven smísením chenodeoxycholové kyseliny o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, kyseliny chloristé o koncentraci 1 mol l^{-1} a acetonitrilu v poměru 1:1:8. Roztok byl měřen v rozsahu potenciálů od -0,9 V do +2,0 V. Roztok této žlučové kyseliny byl vložen do vodní lázně na dobu 5 minut a zahříván na 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C a 50 °C. Na obr. 14 jsou zobrazeny naměřené cyklické voltamogramy. Jak je možné vidět, výška odezvy v oblasti záporných potenciálů stoupá analogicky k výšce odezvy v kladných potenciálech.



Obr. 14 Cyklické voltamogramy kyseliny chenodeoxycholové ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HClO}_4$ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,55 %. Rychlost polarizace elektrody $0,1 \text{ V s}^{-1}$. Měreno v rozsahu $-0,9 \text{ V}$ až $+2,0 \text{ V}$. Voltamogramy zaznamenány po zahřívání po dobu 5 min na uvedenou teplotu.

V následujícím experimentu bylo studováno, zda by nebylo možné docílit stejných výsledků zahříváním roztoku chenodeoxycholové kyseliny na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ v kratších časových intervalech jako při zahřívání ve vodní lázni o $50 \text{ }^\circ\text{C}$ na 5 minut. Roztok chenodeoxycholové kyseliny byl zahříván ve vodní lázni zahřáté na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ v časových intervalech 10 s, 30 s, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min a 5 min. Jak již bylo zmíněno výše, stabilní anodický signál byl získán po 5 minutách zahřívání. Z cyklických voltamogramů na obr. 15A je patrné, že vývoj katodické odezvy je závislý na proběhlé oxidaci. Katodická odezva po zahřívání na dobu 10 sekund má sice srovnatelnou hodnotu s odezvou po 5 minutách zahřívání, ale následně se pak s časem mění a její hodnota není stabilní (obr. 15B). Z těchto měření

je patrné, že vývoj signálu žlučových kyselin bude zřejmě možné urychlit zahřátím roztoku ve vodní lázni o teplotě 50 °C na dobu 5 minut, stejně jako je tomu u signálu v kladných potenciálech. Pro další závěry bude nutné provést obdobné měření s dalšími kyselinami.



Obr. 15 A) Cyklické voltamogramy chenodeoxycholové kyseliny ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) v $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ HClO}_4$ v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,55 %. Rychlost polarizace elektrody $0,1 \text{ V s}^{-1}$. Měřeno v rozsahu $-0,9 \text{ V}$ až $+2,0 \text{ V}$. Voltamogramy zaznamenány po zahřívání na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ v uvedených časových intervalech. B) Závislost výšky proudu katodického signálu (■, pro $E_p = -0,35 \text{ V}$) chenodeoxycholové kyseliny na době zahřívání.

5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo studium elektrochemického chování cholové kyseliny, chenodeoxycholové kyseliny a α -muricholové kyseliny v bezvodém prostředí acetonitrilu v oblasti záporných potenciálů. Z měření bylo potvrzeno, že k detekci vybraných žlučových kyselin v anodické oblasti v prostředí acetonitrilu je důležitá přítomnost dehydratačního činidla [1], v tomto případě je to přítomnost kyseliny chloristé. Byla provedena i kontrolní měření v přítomnosti chloristanu sodného, ale zde nebylo možné rozlišit signál kyselin od signálu základního elektrolytu. Protože mezi měřeními dochází k pasivaci elektrody, bylo nutné BDD elektrodu mezi jednotlivými měřeními leštit. Tím byla zajištěna reprodukovatelnost měření.

Studie prokázala, že všechny tři studované žlučové kyseliny poskytují odezvu po anodické oxidaci ve zpětném katodickém skenu při potenciálu ca $-0,4$ V. Ze studia podmínek vyplývá, že pro tvorbu této odezvy je důležitá přítomnost kyslíku v roztoku. Pokud byl kyslík z měřeného roztoku odstraněn, katodická odezva nebyla pozorována u cholové kyseliny a α -muricholové kyseliny. V případě chenodeoxycholové kyseliny byl i po odstranění kyslíku z roztoku pozorován katodický signál, avšak pouze v minimální míře. Další podmínkou pro vznik tohoto signálu je, že nejdříve musí dojít nejen k oxidaci žlučové kyseliny, ale také k vložení vysokého napětí $+2,0$ V, při kterém dochází na BDD elektrodě k anodickému rozkladu vody za vzniku $\text{OH}\cdot$ radikálů. Ty zřejmě oxidují dále žlučové kyseliny a až právě takto vzniklé produkty je následně možné redukovat. Lze předpokládat například tvorbu ketonů a diketonů, které jsou na elektrodě redukovány na příslušné hydroxysloučeniny. U steroidních sloučenin je například popsána elektrochemická redukce testosteronu nebo hydrocortisonu (cortisol), které obsahují keto skupinu na C_3 steroidního skeletu v allylové pozici vzhledem ke dvojně vazbě ΔC^4 . [66]

Vzhledem k nutnosti přítomnosti kyslíku v roztoku pro zřetelný vývoj katodického signálu lze předpokládat, že zpětně oxiduje redukované formy (tj. hydroxylované formy), které jsou následně opět redukovány na elektrodě a jsou původcem pozorovaných katodických signálů. Vzhledem k redukčnímu potenciálu poměrně blízko nule se musí jednat o poměrně snadno redukovatelné skupiny, například chinoidní struktury. Podobné katalytické cykly byly již popsány například pro doxorubicin [65].

Protože katodická odezva žlučových kyselin není přítomna ihned po přípravě měřeného roztoku, ale nejdříve po 45 minutách, bude úkolem následných studií optimalizovat podmínky jeho stabilizace. Bylo předpokládáno, že zahříváním by mělo dojít k urychlení reakce a vývoji katodického signálu stejně jako tomu je v případě anodického signálu, jak popsal Klouda *et al* [2]. Tento předpoklad se ukázal jako správný. Stejně jako je tomu u oxidačního signálu, dojde k urychlení vývoje signálu redukčního. Pro vývoj signálu v oblastech záporných potenciálů se ukázalo vhodné zahřívání po dobu 5 minut na 50°C. Měření proběhlo pro chenodeoxycholovou kyselinu, která vykazovala oproti zbylým dvěma kyselinám stabilní odezvu. Pro definitivní závěry vhodnosti tohoto postupu bude tedy nutné tyto podmínky prostudovat i pro cholovou a α -muricholovou kyselinu.

Cílem dalšího studia elektrochemického chování žlučových kyselin by mohla být stabilizace jejich katodického signálu a studium mechanismu vedoucí k jeho vzniku. Pro tuto studii mohou být využity jiné elektrodové materiály, na kterých dochází k anodické oxidaci žlučových kyselin za podmínek umožňujících jejich dehydrataci (například elektroda ze skelného uhlíku a platina [1]), ale na kterých nedochází k masivní tvorbě OH• radikálů při vložení potenciálu v oblasti rozkladu vody vzhledem k jinému mechanismu její oxidace a oxidace elektrodového materiálu.

Dále by bylo vhodné prostudovat možnost využití těchto znalostí k detekci žlučových kyselin v průtokových metodách. Nabízí se možnost využití jak anodického, tak katodického signálu, s využitím průtokové injekční analýzy a multipulsní amperometrické detekce, nebo s využitím

separace pomocí HPLC. Zde bude nutno optimalizovat separační podmínky včetně volby kolony, jelikož pro průběh dehydratační reakce jsou nežádoucí vyšší obsahy vody. Je nutné si také uvědomit, že z jedné žlučové kyseliny se může tvořit více dehydratačních produktů, komplikujících optimalizaci separace a detekce.

Seznam literatury

- [1] Klouda, J., Barek, J., Kočovský, P., Herl, T., Matysik, F.-M., Nesmerak, K., Schwarzova-Peckova, K. Bile acids: Electrochemical oxidation on bare electrodes after acid-induced dehydration. *Electrochemistry communication*, 2018, 86, 99–103.
- [2] Klouda, J., Nesměrák, K., Kočovský, P., Barek, J., Schwarzová-Pecková, K. A novel voltammetric approach to the detection of primary bile acids in serum samples. *Bioelectrochemistry*, 2020, 134, 107539.
- [3] Klouda, J. Elektrochemická oxidace žlučových kyselin na elektrodách na bázi uhlíku. Možnosti využití v elektroanalýze. *Diplomová práce*, 2015, Přírodovědecká fakulta UK.
- [4] Haslewood, G.D. Bile salt evolution. *Journal of Lipid Research*, 1967, 8, 535–550.
- [5] Alvarez, M., Jover, A., Carrazana, J., Meijide, F., Soto, V.H., Vazquez Tato, J. Crystal structure of chenodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid and their two 3beta, 7alpha- and 3beta,7 beta-dihydroxy epimers. *Steroids*, 2007, 72, 535–544.
- [6] Coello, A., Meijide, F., Nunez, E.R., Tato, J.V. Aggregation behavior of bile salts in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996, 85, 9–15.
- [7] Hofmann, A., Roda, A. Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties - an overview of the problem. *Journal of Lipid Research*, 1984, 25, 1477–1489.
- [8] Hofmann, A., Mysels, K. Bile acid solubility and precipitation invitro and invivo - the role of conjugation, pH, and Ca²⁺ ions. *Journal of Lipid Research*, 1992, 33, 617–626.
- [9] Mukhopadhyay, S., Maitra, U. Chemistry and biology of bile acids. *Current Science*, 2004, 87, 1666–1683.

- [10] Hofmann, A.F., Hagey, L.R. Bile acids: Chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65, 2461–2483.
- [11] Alnouti, Y., Csanaky, I.L., Klaassen, C.D. Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B – Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2008, 873, 209–217.
- [12] Björkhem, I. Mechanism of bile acid biosynthesis in mammalian liver. *New Comprehensive Biochemistry*, 1985, 12, 231–278.
- [13] Li, T., Chiang, J.Y.L. Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. *PPAR Research*, 2009, 501739.
- [14] Honda, A., Miyazaki, T., Iwamoto, J., Hirayama, T., Morishita, Y., Monma, T., Ueda, H., Mizuno, S., Sugiyama, F., Takahashi, S., Ikegami, T. Regulation of bile acid metabolism in mouse models with hydrophobic bile acid composition. *Journal of Lipid Research*, 2020, 61, 54–69.
- [15] Fu, Z.D., Cui, J.Y., Klaassen, C.D. Atorvastatin induces bile acid-synthetic enzyme Cyp7a1 by suppressing FXR signaling in both liver and Intestine in Mice. *Journal of Lipid Research*, 2014, 55, 2576–2586.
- [16] Stamp, D., Jenkins, G. An overview of bile acid synthesis, chemistry and function. *Issues in Toxicology*, 2008.
- [17] PubChem – Cholic acid
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/221493>
(cit. 26.2.2020).
- [18] Lékopis – Acidum chenodeoxycholicum
http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Acidum_chenodeoxycholicum.htm
(cit. 28.2.2020).

- [19] PubChem – Muricholic acid
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/119473>
(cit. 28.3.2020).
- [20] Sabbatini, P., Filipponi, P., Sardella, R., Natalini, B., Nuti, R., Macchiarulo, A., Pellicciari, R., Gioiello, A. Synthesis and quantitative structure-property relationships of side chain-modified hyodeoxycholic acid derivatives. *Molecules*, 2013, 18, 10497–10513.
- [21] PubChem. Chenodeoxycholic acid
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chenodeoxycholic-acid>
(cit. 30.7.2020).
- [22] Roda, A., Minutello, A., Angellotti, M., Fini, A. Bile-acid structure activity relationship – evaluation of bile-acid lipophilicity using 1-octanol water partition-coefficient and reverse phase HPLC. *Journal of Lipid Research*, 1990, 31, 1433–1443.
- [23] Klouda, J., Barek, J., Nesměrāk, K., Schwarzová-Pecková, K. Non-enzymatic electrochemistry in characterization and analysis of steroid compounds. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2017, 47, 384–404.
- [24] Pecková K., Nesměrāk K.: Electrochemistry of bile acids, cholesterol, and related compounds (An overview). In: *Sensing in Electroanalysis*. Vol. 7. K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytřas (Eds.). Pardubice, University Press Centre 2012. ISBN 978-80-7395-563-2, p. 87–96.
- [25] Ferri, T., Campanella, L., Deangelis, G. Differential-pulse polarographic-determination of cholic acids. *Analyst*, 1984, 109, 923–925.
- [26] Liu, X., Wang, L., Zhang, S., Deng, X., Tang, X., Huang, X. Electrochemical behavior of deoxycholic Acid on multiwalled carbon nanotubes modified electrode. *Electroanalysis*, 2006, 18, 2385–2388.

- [27] Patáková, A. Elektrochemická redukce dehydrocholové a chenodeoxycholové kyseliny na stacionárních rtuťových a amalgámových elektrodách. *Diplomová práce*, 2016, Přírodovědecká fakulta UK
- [28] Pišnová, K. Studium elektrochemického chování kyseliny tauroursodeoxycholové na elektrodách na bázi rtuti. *Diplomová práce*, 2016, Přírodovědecká fakulta UK
- [29] Rákosníková, Š. Studium elektrochemické redukce kyseliny deoxycholové a ursodeoxycholové na rtuťové visící kapkové elektrodě. *Bakalářská práce*, 2014, Přírodovědecká fakulta UK
- [30] Hulová, D. Využití elektrodových materiálů na bázi rtuti ke studiu elektrochemické redukce vybraných žlučových kyselin. *Diplomová práce*, 2015, Přírodovědecká fakulta UK
- [31] Benešova, L., Klouda, J., Patáková, A., Pišnová, K., Nesměrak, K., Barek, J., Pecková, K. *Electrochemistry of selected bile acids and phytosterols at bare electrodes*, in M. Fojta, T. Navrátil, K. Schwarzová, (Eds.) 32nd International Conference on Modern Electrochemical Methods, Best Servis, Ústí nad Labem, Jetřichovice, 2013, p. 24–28.
- [32] Yershova, P. Vývoj voltametrických metod pro detekci cholesterolu na bórem dopované diamantové elektrodě. *Bakalářská práce*, 2018, Přírodovědecká fakulta UK
- [33] Bláhová, E. Voltametrické chování cholesterolu na elektrodě ze skelného uhlíku. *Bakalářská práce*, 2019, Přírodovědecká fakulta UK
- [34] Benešová, L. Vývoj elektroanalytických metod pro detekci cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu. *Diplomová práce*, 2018, Přírodovědecká fakulta UK
- [35] Zářybnická, A. Voltametrie 7-dehydrocholesterolu na bórem dopované diamantové elektrodě. *Bakalářská práce*, 2018, Přírodovědecká fakulta UK

- [36] Zárbybnická, A. Voltametrické stanovení 7-dehydrocholesterolu jako biomarkeru Smithova-Lemliho-Opitzova syndromu. *Diplomová práce*, 2020, Přírodovědecká fakulta UK
- [37] Jelšíková, K. Voltametrie fytosterolů na borem dopované diamantové elektrodě. *Bakalářská práce*, 2018, Přírodovědecká fakulta UK
- [38] Zelenský, M. Voltametrické chování fytosterolů na elektrodě ze skelného uhlíku. *Bakalářská práce*, 2018, Přírodovědecká fakulta UK
- [39] Dutta, M., Cai, J., Gui, W., Patterson, A.D. A review of analytical platforms for accurate bile acid measurement. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411, 4541–4549.
- [40] Murphy, G. A fluorimetric and enzymatic method for estimation of serum total bile acids. *Journal of Clinical Pathology*, 1970, 23, 594–598.
- [41] Mashige, F., Tanaka, N., Maki, A., Kamei, S., Yamanaka, M. Direct spectrophotometry of total bile-acids in serum. *Clinical Chemistry*, 1981, 27, 1352–1356.
- [42] Zhang, G.H., Cong, A.R., Xu, G.B., Li, C.B., Yang, R.F., Xia, T.A. An enzymatic cycling method for the determination of serum total bile acids with recombinant 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 326, 87–92.
- [43] Li, T., Apte, U. Bile acid metabolism and signaling in cholestasis, inflammation and cancer. *Advances in Pharmacology*, 2015, 74, 263–302.
- [44] Street, J.M., Setchell, K.D.R. Chromatographic methods for bile acid analysis. *Biomedical Chromatography*, 1987, 2, 229–241.
- [45] Pyka, A., Dolowy, M. Separation of selected bile acids by TLC. II. one-dimensional and two-dimensional TLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 2004, 27, 2031–2038.

- [46] Dolowy, M. Application of selected topological indices to predict retention parameters of selected bile acids separated on modified TLC plates. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2008, 65, 51–57.
- [47] Shi, Y., Xiong, J., Sun, D., Liu, W., Wei, F., Ma, S., Lin, R. Simultaneous quantification of the major bile acids in artificial calculus bovis by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and its application in quality control. *Journal of Separation Science*, 2015, 38, 2753–2762.
- [48] Hernanz, A., Codoceo, R. An improved high-performance liquid-chromatographic determination of conjugated bile acids in serum using paired-ion chromatography. *Clinica Chimica Acta*, 1985, 145, 197–203.
- [49] Onishi, S., Itoh, S., Ishida, Y. Assay of free and glycine-conjugated and taurine-conjugated bile acids in serum by high-pressure liquid-chromatography by using post-column reaction after group separation. *Biochemical Journal*, 1982, 204, 135–139.
- [50] Vandenhoevel, W., Sweeley, C., Horning, E. Microanalytical separations by gas chromatography in the sex hormone and bile acid series. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1960, 3, 33–36.
- [51] Batta, A.K., Salen, G. Gas chromatography of bile acids. *Journal of Chromatography B – Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1999, 723, 1–16.
- [52] Griffiths, W.J., Sjoval, J. Bile acids: Analysis in biological fluids and tissues. *Journal of Lipid Research*, 2010, 51, 23–41.
- [53] Yamaga, N., Ikebuchi, J., Kohara, H., Ogura, Y., Yamada, K. Analysis of bile acids in urine specimens from healthy humans: Determination of several bile acids with beta-hydroxyl and carbonyl groups. *Biochemical Journal*, 1996, 119, 725–730.
- [54] Kimura, A., Suzuki, M., Murai, T., Inoue, T., Kato, H., Hori, D., Nomura, Y., Yoshimura, T., Kurosawa, T., Tohma, M. Perinatal bile

- acid metabolism: Analysis of urinary bile acids in pregnant women and newborns. *Journal of Lipid Research*, 1997, 38, 1954–1962.
- [55] Mahara, R., Takeshita, H., Kurosawa, T., Ikegawa, S., Tohma, M. Determination of 1 β -hydroxylated bile acids and related compounds in human biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Sciences*, 1987, 3, 449–452.
- [56] Kumar, B.S., Chung, B.C., Lee, Y.-J., Yi, H.J., Lee, B.-H., Jung, B.H. Gas chromatography-mass spectrometry based simultaneous quantitative analytical method for urinary oxysterols and bile acids in rats. *Analytical Biochemistry*, 2011, 408, 242–252.
- [57] Bettarello, L., Bortolini, O., Fantin, G., Guerrini, A. Mixed oxo-hydroxy bile acids as actual or potential impurities in ursodeoxycholic acid preparation: A ¹H and ¹³C NMR study. *Il Farmaco*, 2000, 55, 51–55.
- [58] Duarte, I.F., Legido-Quigley, C., Parker, D.A., Swann, J.R., Spraul, M., Braumann, U., Gil, A.M., Holmes, E., Nicholson, J.K., Murphy, G.M., Vilca-Melendez, H., Heaton, N., Lindon, J.C. Identification of metabolites in human hepatic bile using 800 MHz ¹H NMR spectroscopy, HPLC-NMR/MS and UPLC-MS. *Molecular BioSystems*, 2009, 5, 180–190.
- [59] Dekker, R., Vandermeer, R., Olieman, C. Sensitive pulsed amperometric detection of free and conjugated bile acids in combination with gradient reversed-phase HPLC. *Chromatographia*, 1991, 31, 549–553.
- [60] Chaplin, M. Analysis of bile acids and their conjugates using high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography B – Biomedical Sciences and Applications*, 1995, 664, 431–434.
- [61] 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*, 1995, 115, 249–253.

- [62] Yano, T., Popa, E., Tryk, D.A., Hashimoto, K., Fujishima, A. Electrochemical behavior of highly conductive boron-doped diamond electrodes for oxygen reduction in acid solution. *Journal of The Electrochemical Society*, 1999, 146, 1081–1087.
- [63] Wadhawan, J.D., Welford, P.J., McPeak, H.B., Hahn, C.E.W., Compton, R.G. The simultaneous voltammetric determination and detection of oxygen and carbon dioxide – a study of the kinetics of the reaction between superoxide and carbon dioxide in non-aqueous media using membrane-free gold disc microelectrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical.*, 2003, 88, 40–52.
- [64] Enache, T.A., Chiorcea-Paquim, A.-M., Fatibello-Filho, O., Oliveira-Brett, A.M. Hydroxyl radicals electrochemically generated in situ on a boron-doped diamond electrode. *Electrochemistry Communications*, 2009, 11, 1342–1345.
- [65] Vacek, J., Havran, L., Fojta, M. Ex situ voltammetry and chronopotentiometry of doxorubicin at a pyrolytic graphite electrode: Redox and catalytic properties and analytical applications. *Electroanalysis*, 2009, 21, 2139–2144.
- [66] Levent, A., Altun, A., Yardim, Y., Senturk, Z. Sensitive Voltammetric determination of testosterone in pharmaceuticals and human urine using a glassy carbon electrode in the presence of cationic surfactant. *Electrochimica Acta*, 2014, 128, 54–60.