

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jan Klouda

ELEKTROCHEMICKÁ OXIDACE VYBRANÝCH ŽLUČOVÝCH KYSELIN V ACETONITRILU

Electrochemical Oxidation of Selected Bile Acids in Acetonitrile

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Karel Nesměrák Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení

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

Jsem si vědom 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 31. srpna 2013

Abstrakt

Použití voltametrie pro stanovení žlučových kyselin a příbuzných látek je v literatuře zaznamenáno, avšak v naprosté většině případů této metodě předchází separační krok. Cílem této bakalářské práce bylo vyvinutí metody pro přímé stanovení a případně i identifikaci šesti vybraných žlučových kyselin. Měření probíhala v nevodném prostředí acetonitrilu za použití DC voltametrie. Jako pracovní elektroda byly použity platinová elektroda a elektroda ze skelného uhlíku, v obou případech v rotujícím uspořádání. Z výsledků měření vyplynulo, že platinová elektroda není pro toto použití vhodná. Elektroda ze skelného uhlíku skýtá určitý potenciál pro stanovení a identifikaci žlučových kyselin, avšak identifikace je téměř vyloučena velkou podobností půlvlnových potenciálů.

Abstract

The use of voltammetry for determining bile acids and similar compounds is described in literature, but in most cases separation precedes. The goal of this bachelor's thesis was to develop a method for direct determination and identification of seven selected bile acids. The experiments were carried out in non-aqueous medium of acetonitrile using DC voltammetry. As the working electrode a rotating disc platinum electrode and a rotating disc glassy carbon electrode were employed. Platinum electrode proved not to be suitable for this kind of use. The GCE on the other hand showed some potential, but the chemical properties of the bile acids exclude its use in terms of identification.

Klíčová slova

žlučová kyselina, DC voltametrie, platinová elektroda, elektroda ze skelného uhlíku

Key words

bile acid, DC voltammetry, platinum electrode, glassy carbon electrode

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli, panu doktoru Nesměrákovi za cenné rady, za jeho trpělivost a čas, který mi věnoval při práci v laboratoři i při sepisování práce. Dále bych rád poděkoval paní doktorce Peckové za užitečné konzultace. A v neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za podporu a Kristině Petříčkové za trpělivé pročtení práce a užitečné připomínky.

Obsah

Seznam zkratk	6
1 Teoretická část	7
1.1 Cíl práce.....	7
1.2 Žlučové kyseliny.....	7
1.2.1 Struktura žlučových kyselin	8
1.2.2 Biochemie žlučových kyselin.....	9
1.2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti žlučových kyselin	12
1.2.4 Strukturně příbuzné látky žlučovým kyselinám.....	13
1.3 Analytická chemie žlučových kyselin	13
1.4 Redoxní vlastnosti žlučových kyselin a jejich elektrochemie	14
1.4.1 Elektrochemická redukce žlučových kyselin	14
1.4.2 Elektrochemická oxidace žlučových kyselin	14
2 Experimentální část.....	18
2.1 Studované látky	18
2.2 Použité chemikálie.....	18
2.3 Metody měření a zpracování dat	18
2.3.1 Příprava zásobních roztoků žlučových kyselin	18
2.3.2 DC voltametrie	18
3 Výsledky a diskuze	20
3.1 Voltametrická měření	20
3.2 Diskuze	27
4 Závěr	30
Literatura	31

Seznam zkratek

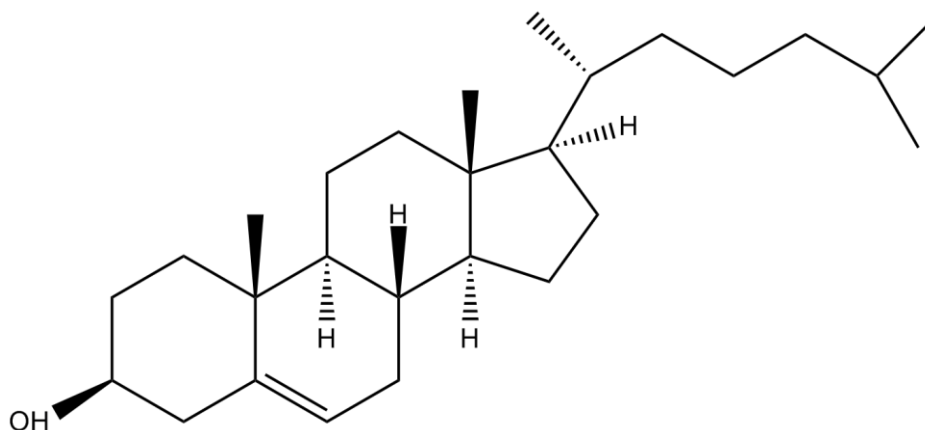
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
c	molární koncentrace [mol l^{-1}]
CMC	kritická micelární koncentrace
DC	<i>direct-current</i>
DME	kapající rtuťová elektroda
E	potenciál [mV]
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál [mV]
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
I	proud [μA]
I_{lim}	limitní konvektivě-difuzní proud [μA]

1 Teoretická část

1.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo shromáždit literární data o možnostech elektrochemické oxidace žlučových kyselin a na jejich základě porovnat elektrochemické vlastnosti vybraných žlučových kyselin při jejich přímé oxidaci v nevodném prostředí acetonitrilu a zároveň porovnat vhodnost různých elektrodových materiálů pro tyto oxidace v rozsahu, jaký nebyl dosud publikován.

1.2 Žlučové kyseliny



Obr. 1.1 Chemická struktura cholesterolu

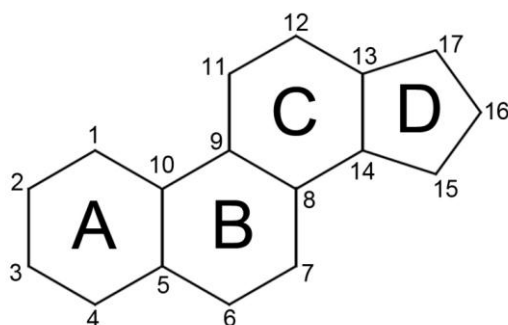
Žlučové kyseliny jsou organické látky odvozené od cholesterolu (obr. 1.1). V konjugované formě jsou to amfipatické molekuly, které jsou konečnými produkty metabolismu cholesterolu a z fyziologického hlediska se podílejí na zažívání a vstřebávání tuků [1]. Jejich značná chemická diverzita může být vysvětlena evolucí různých biochemických pochodů, které slouží k přeměně ve vodě špatně rozpustného cholesterolu na látky ve vodě rozpustné. Ze žluči byly tyto kyseliny poprvé izolovány na počátku 19. století, kdy ještě nebyla známa jejich struktura, proto lze původ názvu jednotlivých kyselin hledat ve jméně organismu, ze

kterého byla konkrétní kyselina izolována, nebo ve kterém převládala a později v poznacích získaných elementární analýzou (například tauroursodeoxycholová kyselina: *taurus* – lat. býk, *ursus* – lat. medvěd, *chol* – řec. žluč). Proto také neplatí hierarchie názvosloví, tedy že základní sloučenině bude odpovídat název, od kterého budou další pojmenování odvozována. Jako příklad lze uvést chenodeoxycholovou kyselinu, jejíž název naznačuje, že se jedná o žlučovou kyselinu převládající u hus a obsahuje o atom méně kyslíku než kyselina cholová, která byla objevena o téměř století dříve. V době izolace a pojmenování chenodeoxycholové kyseliny však nikdo netušil, že se jedná o základní stavební kámen všech C_{24} žlučových kyselin, tedy i cholové kyseliny.

1.2.1 Struktura žlučových kyselin

Na základě počtu atomů uhlíku v molekule rozlišujeme dvě základní skupiny, a to C_{27} a C_{24} žlučové kyseliny [1]. Tyto dvě skupiny zahrnují naprostou většinu žlučových kyselin. Žlučové kyseliny s 27 uhlíky obsahují na C_{17} cholesterolového skeletu postranní řetězec s osmi uhlíky, u kyselin s 24 uhlíky je tento řetězec zkrácen na pět uhlíků. U savců dominují právě C_{24} žlučové kyseliny. Velice vzácně se u obratlovců mohou vyskytovat žlučové kyseliny obsahující jiné postranní řetězce, například C_4 , C_7 nebo C_9 . Ve struktuře je přítomna vždy jedna karboxylová skupina a několik hydroxylových skupin a/nebo oxoskupin.

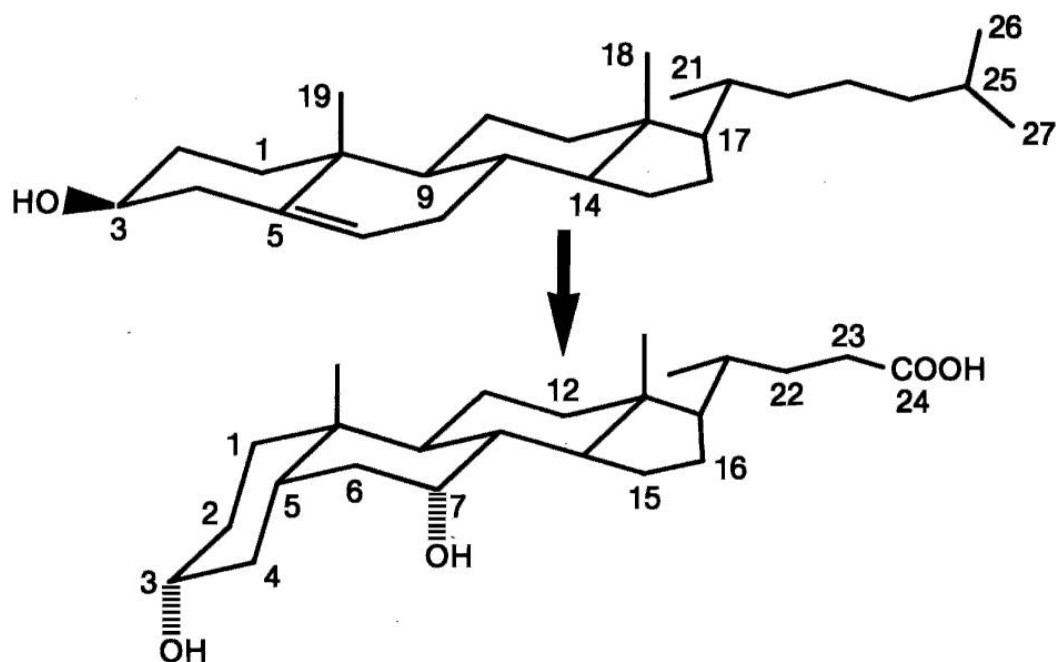
Žlučové kyseliny obsahují typicky karboxylovou skupinu na posledním uhlíku (tedy C_{27} nebo C_{24}), hydroxylovou na C_3 , což je pozůstatek cholesterolu a dále hydroxylovou nebo oxo skupinu na C_7 , protože rychlost určujícím faktorem při jejich syntéze z cholesterolu je aktivita enzymu cholesterol 7α -hydroxylasy. Základní kyselinu C_{27} skupiny představuje cholestanová kyselina, C_{24} skupiny chenodeoxycholová kyselina. Při syntéze žlučových kyselin z cholesterolu mohou být tyto základní látky dále hydroxylovány na steroidním jádru, postranním řetěci, a nebo na obou, což poskytuje spektrum přirozeně se vyskytujících žlučových kyselin. U C_{24} žlučových kyselin se mohou vyskytnout dvě dodatečné změny struktury. První je epimerizace 7α -hydroxylové skupiny, která poskytne $3\alpha,7\beta$ -dihydroxy žlučovou kyselinu, pojmenovanou jako ursodeoxycholová kyselina. Druhou je pak oxidace C_7 hydroxylové skupiny, poskytující 3α -hydroxy-7-oxo žlučovou kyselinu (bez triviálního názvu). Přehled struktur vybraných žlučových kyselin poskytuje tab. 1.1.

Tab. 1.1 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
dehydrocholová	3 O	7 O	12 O	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
litocholová	3 α OH			17 C(CH ₃)CH ₂ CH ₂ COOH
ursodeoxycholová	3 α OH	7 β OH		17 C(CH ₃)CH ₂ CH ₂ COOH
tauroursodeoxycholová	3 α OH	7 β OH		17 C(CH ₃)CH ₂ CH ₂ CONHCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻

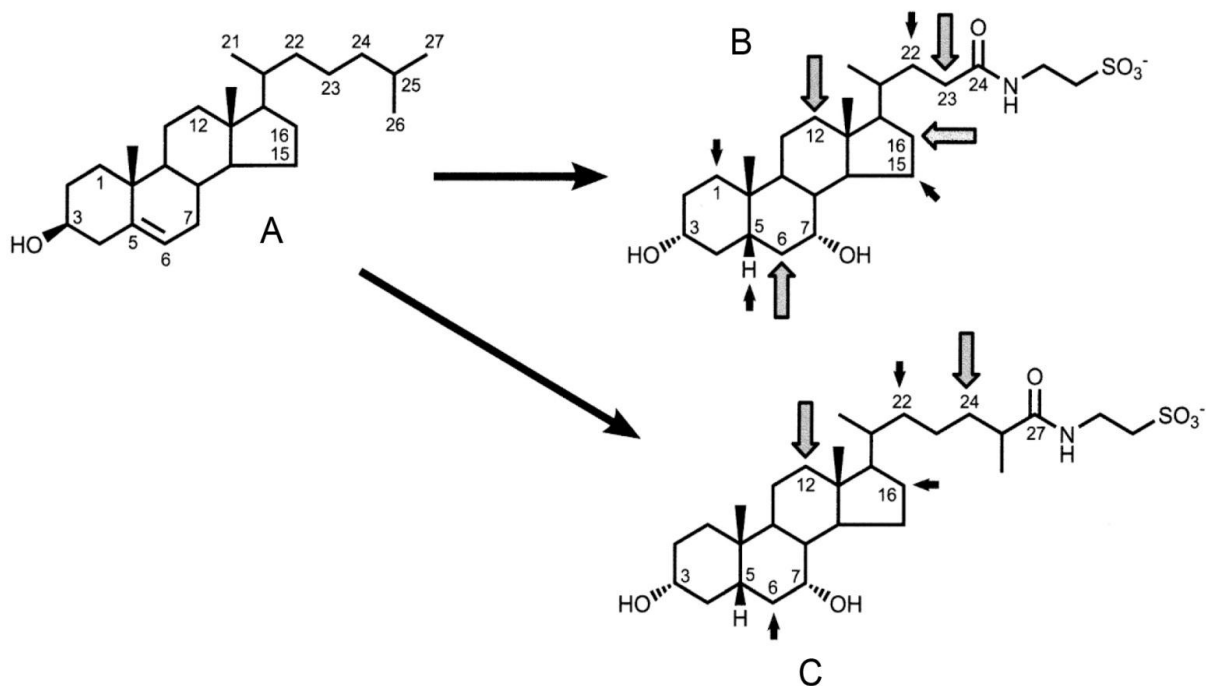
1.2.2 Biochemie žlučových kyselin

V organismu vznikají žlučové kyseliny biotransformací z cholesterolu v játrech, resp. hepatocytech, působením řady enzymů rodiny cytochromu P450 v hladkém endoplasmatickém retikulu [1]. Nejprve dochází k zániku dvojné vazby na cholesterolovém kruhu adicí jedné nebo dvou hydroxylových skupin, poté je případně zkrácen postranní řetězec o tři uhlíky (u C₂₄ kyselin) a konečně je terminální uhlík je oxidován za vzniku karboxylové skupiny. Ve většině jak C₂₄, tak C₂₇ žlučových kyselin je cyklopentanofenanthrenové (steroidní) jádro, složené z kruhů A, B, C a D, nasycené. Při syntéze žlučových kyselin proběhne isomerace $\Delta^{5,6}$ dvojné vazby na vazbu $\Delta^{4,5}$, která je poté zredukována, což poskytne 5 β žlučové kyseliny, ve kterých jsou kruhy A a B v *cis* konfiguraci (5 β atom vodíku). V důsledku toho leží hydrofilní skupiny na jedné straně a hydrofobní skupiny na druhé straně molekuly (viz dále kap. 1.2.3). Avšak u některých plazů a ve velmi limitovaném výskytu i u savců se může tato redukce lišit a může vznikat žlučová kyselina, která má kruhy A a B v *trans* konfiguraci (5 α atom vodíku).



Obr. 1.2 Konverze cholesterolu na chenodeoxycholovou kyselinu (převzato z [1]).

Cholová a chenodeoxycholová kyselina (obr. 1.2), které jsou nazývány primární žlučové kyseliny, jsou nejvýznamnějšími metabolity cholesterolu. Po biosyntéze jsou primární žlučové kyseliny aktivovány koenzymem A a konjugovány s glycinem nebo taurinem. Při této konjugaci je karboxylová skupina žlučové kyseliny spojena s amino skupinou taurinu (glycinu) amidovou vazbou (obr. 1.3). Konjugáty žlučových kyselin bývají také někdy nazývány soli žlučových kyselin. Pro C_{24} žlučové kyseliny je známo pět druhů konjugace. První možností je vytvoření *N*-acyl amidové vazby s glycinem nebo taurinem, druhou sulfatace, třetí C_{24} esterová glukuronidizace, čtvrtou etherová konjugace na C_3 (je možná i na jiných částech jádra) a pátou je C_7 *N*-acetylglukosaminace pro žlučové kyseliny jako například UDCA s β -hydroxylovými skupinami. Žlučové kyseliny mohou podstupovat konjugaci jak na steroidním jádře, tak na postranním řetězci.



Obr. 1.3 Chemické struktury (A) cholesterolu, (B) chenodeoxycholové kyseliny, (C) cholestanové kyseliny. Obě kyseliny jsou zobrazeny v konjugované formě s taurinem (převzato z [1], upraveno).

Soli primárních žlučových kyselin jsou se žlučí transportovány do střeva, kde jsou vystaveny bakteriím a podstupují další modifikaci jejich enzymy, například odebrání, oxidaci či epimerizaci hydroxylových skupin na steroidním jádře. Takto vznikající modifikované žlučové kyseliny jsou nazývány žlučovými kyselinami sekundárními. Častým způsobem jejich vzniku je odebrání C₇ hydroxylové skupiny anaerobními bakteriemi. Tím vzniká nový druh žlučových kyselin, který je nazýván 7-deoxy žlučovými kyselinami. Nejběžnějšími C₂₄ 7-deoxy žlučovými kyselinami jsou lithocholová kyselina (vznikající z chenodeoxycholové kyseliny) a deoxycholová kyselina (vznikající z cholové kyseliny). U C₂₇ žlučových kyselin také dochází k modifikacím hydroxylových skupin bakteriemi. Na obr. 1.3 jsou zobrazeny základní C₂₄ a C₂₇ žlučové kyseliny (konjugované s taurinem) a šipky zobrazují místa dodatečné hydroxylace žlučových kyselin. Místa, kde hydroxylace probíhá častěji, jsou zobrazena většími šipkami, méně často hydroxylovaná místa pak šipkami menšími.

Sekundární žlučové kyseliny podléhají velkému enterohepatálnímu oběhu, jsou tedy po svém vzniku ve střevě znovu absorbovány do krevního oběhu a vrací se do jater. O tom

svědčí to, že ze vznikajícího množství 15–30 g solí žlučových kyselin se ve stolici objeví pouze 0,5 g denně, což přibližně koresponduje s množstvím cholesterolu syntetizovaného v organismu za jeden den.

1.2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti žlučových kyselin

Žlučové kyseliny jsou díky svému amfipatickému charakteru povrchově aktivní molekuly: obsahují hydrofobní část (β část molekuly žlučové kyseliny), která neobsahuje žádné substituenty, a hydrofilní část (α část molekuly žlučové kyseliny) obsahující hydroxylové skupiny. Anionty žlučových kyselin se shlukují do micel v poměrně úzkém rozmezí koncentrací, označovaném jako kritická micelární koncentrace (CMC), nad niž vznikají micely o přibližně 4–40 molekulách [2–4]. Kritická micelární koncentrace C_{24} žlučových kyselin byla intenzivně studována [5–6]; typicky stoupá s přibývajícím počtem hydroxylových skupin na steroidní molekule. Konjugace s glycinem či taurinem má za důsledek její drobné snížení [5]. Hodnoty kritické micelární koncentrace C_{24} žlučových kyselin jsou v rozmezí od $9 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (chenodeoxycholová kyselina) do $60 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ (ursocholová kyselina) ve vodě o teplotě 25 °C. V přítomnosti $0,15 \text{ mol l}^{-1} \text{ Na}^+$ iontů (simulujících fyziologické prostředí) se předpokládají o něco nižší hodnoty ($0,6 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ až $39 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) [6]. Pro C_{27} žlučové kyseliny neexistují žádná data, avšak hodnoty jejich CMC by měly být nižší než pro odpovídající C_{24} homology kvůli jejich delším postranním řetězcům.

Žlučové kyseliny se mohou v biologických systémech vyskytovat v několika formách: nerozpustná, protonovaná kyselina; rozpuštěná protonovaná kyselina a/nebo její aniont; micela; součást složitější smíšené micely a nebo nerozpustná vápenatá sůl [4]. Srážení žlučových kyselin ve formě nerozpustné, protonované kyseliny je řízeno zejména hodnotou pH, srážení ve formě nerozpustné vápenaté soli pak aktivitou Ca^{2+} iontů a strukturou aniontu žlučové kyseliny. To má význam především v živých organismech. Ve vodě rozpustnost nekonjugovaných žlučových kyselin stoupá s počtem hydroxylových skupin od jedné ke třem. S taurinem konjugované žlučové kyseliny jsou rozpustné při silně kyselém pH, konjugované s glycinem jsou špatně rozpustné při mírném pH a mnoho běžných, přirozeně nekonjugovaných žlučových kyselin je nerozpustných při neutrálním pH. Jak pro žlučové kyseliny konjugované s glycinem, tak nekonjugované stoupá rozpustnost exponenciálně

s rostoucím pH, dokud koncentrace aniontu nedosáhne CMC, kdy se začnou formovat micely a rozpustnost se stane prakticky neomezenou.

1.2.4 Strukturně příbuzné látky žlučovým kyselinám

Další důležité sloučeniny odvozené od cholesterolu jsou steroly rostlin nazývané fytoosteroly. Jejich chemická struktura se liší od cholesterolu přítomností modifikovaného postranního řetězce na C₂₄. Jsou také jinak metabolizovány, takže savci nejsou schopni jejich syntézy. Fytoosteroly a jejich estery jsou například klinicky využívány pro snížení nízkodenzitního lipoproteinu a rizika aterosklerózy [7].

1.3 Analytická chemie žlučových kyselin

Široké spektrum přirozeně se vyskytujících steroidních sloučenin a jejich malé strukturální rozdíly vyžadují vhodné analytické metody pro jejich studium, neboli „*fit for purpose*“. Běžnými technikami pro stanovení těchto sloučenin v biologické a fyziologické matrici jsou především metody chromatografické, ale také elektrochemické, enzymatické a imunochemické [8–10].

Z chromatografických metod pro stanovení žlučových kyselin lze zmínit především HPLC-UV, avšak vysoká podobnost struktur žlučových kyselin a nízká absorpce UV záření vede k limitované selektivitě a citlivosti této metody. Limit detekce je pro HPLC-UV $15 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ [11]. Jinou kombinací je HPLC-MS. Při stanovení žlučových kyselin tímto způsobem lze látky separovat například na C18 Kinetex koloně (15 cm × 2,1 mm ID) naplněnou „*core-shell*“ částicemi o tloušťce 2,6 μm, jako mobilní fázi použít například směs methanolu a acetonitrilu (75:25, v/v) a vodu, v obou případech obsahující $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ mravenčanu amonného [12]. Analyty mohou být stanoveny při negativní ionizaci s kapilárním napětím – 4200 V při teplotě 200 °C. Limit detekce je v takovém případě pro cholovou kyselinu $5 \times 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$.

1.4 Redoxní vlastnosti žlučových kyselin a jejich elektrochemie

Jak oxidace, tak i redukce žlučových kyselin je prozatím méně probádanou oblastí analytické chemie. V následujících odstavcích budou shrnuty nejdůležitější aspekty elektrochemických vlastností zkoumaných látek a látek jim podobných. Ač se tato bakalářská práce zabývá oxidací, je vhodné se v rámci širšího pohledu na téma zmínit i o redukci. Dosavadní poznatky o žlučových kyselinách a jejich elektrochemii jsou přehledně shrnuty v práci Peckové a Nesměráka [13].

1.4.1 Elektrochemická redukce žlučových kyselin

Redukci žlučových kyselin umožňuje přítomnost karboxylových skupin na uhlících C₂₄ či C₂₇. Redukčními procesy se zabývalo pouze malé množství studií a jediná elektroda, která byla s úspěchem použita, je klasická kapající rtuťová elektroda (DME). Byla použita pro diferenční pulzní polarografické stanovení cholové, deoxycholové a ursodeoxycholové, chenodeoxycholové a litholové kyseliny v lidské žluči nebo ve farmakách [14]. Aktivita volných žlučových kyselin je charakterizována přítomností dobře vyvinutého píku, nezávislého na pH v potenciálovém rozmezí od -1150 mV do -1350 mV (proti nasycené argentchloridové elektrodě), ursodeoxycholová kyselina se redukuje při potenciálu o přibližně 100 mV pozitivnějším. Pro stanovení je vhodné prostředí od slabě kyselého do slabě zásaditého z důvodu možné interference signálu kyseliny cholové a počátku polarografické křivky v důsledku vývoje vodíku. Konjugáty s taurinem i glycinem se chovají velmi podobně. Díky podobnosti redukčních potenciálů je tato metoda vhodná pro stanovení celkové koncentrace žlučových kyselin v lidské žluči na úroveň 10⁻⁶ mol dm⁻³.

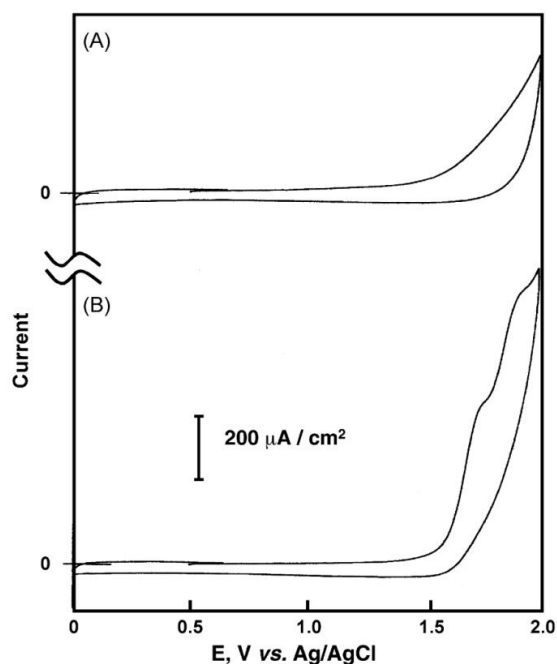
1.4.2 Elektrochemická oxidace žlučových kyselin

Studií věnujících se elektrochemické oxidaci žlučových kyselin je poměrně málo, pozornost byla soustředěna především na cholesterol a příbuzné látky [15–20] a fytosteroly [21]. Elektrochemická oxidace žlučových kyselin je jen těžko dosažitelná, a když, tak většinou pouze v nevodném prostředí nebo v prostředí s vysokým obsahem organické složky [22].

Jiným způsobem je nepřímá oxidace za pomoci mediátorového iontu [22, 23], což je obecný postup jak oxidovat alifatickou hydroxylovou skupinu s vysokým oxidačním potenciálem. Nepřímá anodická elektrochemická oxidace cholové kyseliny vede k syntéze různorodých oxo-cholových kyselin. Pořadí oxidace hydroxylových skupin je následující: $C_7 > C_{12} > C_3$ (cit. [22]).

Medici *et al.* [22, 23] použili jako mediátorový iont Cl^- a Ti/PbO_2 , platinovou a grafitovou elektrodu k oxidaci hydroxylových skupin cholové kyseliny a vyhodnotili regioselektivitu oxidace pro jednotlivé elektrodové materiály a experimentální podmínky. Jako základní elektrolyt byl použit chloristan sodný a jako mediátor chlorid sodný. Pokud se reakce ukončí dříve, lze ve směsi najít i další sloučeniny (7-oxo, 12-oxo, 7,10-dioxo deriváty). Mezi výhody elektrochemické oxidace oproti konvenčním metodám zahrnují: mírné reakční podmínky, nezávislost na chemickém redoxním reagentu, lepší využití surovin, jednodušší izolaci produktů. Při použití elektrického proudu jako oxidantu je také neméně důležitá eliminace potenciálních polutantů životního prostředí jako např. manganistanu či kyseliny chromové.

Hojó *et al.* [16] se zabývali studiem oxidace cholesterolu a vybraných oxysterolů, fytosterolů a příbuzných sloučenin v bezvodých prostředích. Cholesterol může být oxidován při silně pozitivním potenciálu na elektrodě ze skelného uhlíku ve směsi acetonitrilu a 2-propanolu (9:1, v/v) obsahujícím $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan lithný jako základní elektrolyt. Nejprve byly provedeny pokusy na zlaté elektrodě, protože je obecně známo, že je vhodná k elektrooxidaci hydroxylových skupin cukrů. Avšak, pravděpodobně kvůli adsorpci reakčních produktů cholesterolu na elektrodu, nebyly tyto výsledky příliš reprodukovatelné. Pík cholesterolu se na elektrodě ze skelného uhlíku objevil okolo 1,8 V proti $Ag/AgCl$. Voltamogram pořízený za těchto podmínek je zobrazen na obr. 1.4. Je vidět, že jistý proud byl naměřen i při absenci vzorku. To může být způsobeno oxidací povrchu uhlíkové elektrody a/nebo rozpouštědel. Limit detekce cholesterolu byl $3,6 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Později bylo prokázáno, že oxidace cholesterolu v acetonitrilu probíhá čtyřelektronovým, čtyřprotonovým přenosem na cholestea-4,6-dien-3-on. To naznačuje, že místem elektrochemické oxidace je hydroxylová skupina v pozici 3β . Toto bylo potvrzeno oxidací cholestanolu, který měl ve struktuře pouze 3β hydroxylovou skupinu.



Obr. 1.4 Cyklické voltamogramy na elektrodě ze skleného uhlíku v prostředí acetonitril:2-propanol (9:1, v/v) obsahující $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ LiClO_4 v nepřítomnosti (A) nebo přítomnosti $0,45 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ cholesterolu (B). Rychlost scanu 0.1 V/s , potenciál měřen proti Ag/AgCl referenční elektrodě (převzato z [16]).

Kotani *et al.* [19] použili pro stanovení obsahu cholesterolu v různých vzorcích masa borem dopovanou diamantovou elektrodu (BDDE). Tu použili v kombinaci HPLC-ED v průtokové cele. Jako základní elektrolyt posloužil $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ roztok chloristanu lithného v acetonitrilu. Po optimalizaci metody byl zjištěn limit detekce $8 \times 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$ při potenciálu $+2,2 \text{ V}$ proti Ag/AgCl referenční elektrodě. Výsledky stanovení byly validovány se stanovením cholesterolu certifikovanou metodou (isotopové zředění měřené GC-MS). Navíc i přes to, že vzorky masa mají poměrně složitou matici, zůstala odezva BDDE stabilní po dobu delší než čtyř měsíců (při osmi analýzách denně).

Matsunaga *et al.* [20] použili metodu semi-mikro HPLC-ED s acetonitrilem obsahujícím $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan lithný jako mobilní fázi a s C30 mikroborovou kolonou; jako vnitřní standard byl použit rostlinný sterol stigmasterol. Aplikovaný potenciál byl $2,8 \text{ V}$ proti Ag/AgCl referenční elektrodě. Pracovní elektrodou byla elektroda ze skelného uhlíku. Tato metoda byla použita pro stanovení oxysterolů v oxidačně modifikovaném nízkodenzitní lipoproteinu. Metoda má oproti stávajícím několik výhod, jmenujme například to, že oproti certifikované metodě isotopového zředění měřeného GC-MS nevyžaduje přečištění po derivatizaci, ani přípravu isotopově značeného vnitřního standardu. V porovnání s LC-MS se tato metoda pro stanovení oxysterolů v oxidačně modifikovaném nízkodenzitní lipoproteinu

ukázala obdobně citlivou, avšak levnější. Díky tomu se jedná o metodu, kterou lze použít v laboratořích, které nedisponují GC-MS a LC-MS, ale mají k dispozici HPLC systém.

Prezentované metody umožňující přímou detekci cholesterolu, fytosterolu a příbuzných sloučenin bez předchozí derivatizace ukazují velký potenciál, který se v tomto alternativním přístupu k jejich detekci skrývá.

2 Experimentální část

2.1 Studované látky

Byla studována elektrochemická oxidace šesti vybraných žlučových kyselin: dehydrocholová, deoxycholová, cholová, lithocholová, tauroursodeoxycholová a ursodeoxycholová kyselina. Látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Deklarovaná minimální koncentrace byla 99,98%.

2.2 Použité chemikálie

Ostatní použité chemikálie byly (pokud není udáno jinak) analytické čistoty: acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich), bezvodý chloristan sodný pro HPLC (Fluka), dusičnan stříbrný Ph. Eur. 3 (Fluka), hexakynoželeznatan draselný (Lachema), kyselina dusičná 65% (Lach-Ner), kyselina sírová 96% (Lach-Ner), methanol pro HPLC (Sigma-Aldrich).

2.3 Metody měření a zpracování dat

2.3.1 Příprava zásobních roztoků žlučových kyselin

Zásobní roztoky studovaných žlučových kyselin o koncentraci $1 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ byly připraveny přesným odvážením příslušného množství žlučové kyseliny a jeho rozpuštěním v 1 ml methanolu.

2.3.2 DC voltametrie

Voltametrická měření byla prováděna na přístroji Eko-Tribo Polarograf (Polaro-Sensors, ČR). Jako základní elektrolyt byl použit $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ roztok chloristanu sodného v acetonitrilu. Do elektrochemické cely bylo nedělenou pipetou pipetováno 10 ml základního elektrolytu a byl změřen voltamogram základního elektrolytu. Poté byl postupně (v přídavicích o objemu 50 μl) přidáván zásobní roztok studované žlučové kyseliny do celkového objemu přídávku 200 μl .

Po každém přidavku byla zaznamenána voltametrická křivka. Mezi jednotlivými měřeními byl povrch elektrody čištěn buničinou.

Měření probíhalo metodou *direct current* (DC) voltametrie, tedy voltametrie za použití stejnosměrného proudu. Potenciálové rozmezí, ve kterém měření probíhalo, bylo nastaveno na 1,4–2,2 V. Měření probíhalo v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byly: a) rotující disková platinová elektroda ($d = 2$ mm) firmy Radiometer Copenhagen (Dánsko), b) rotující disková elektroda ze skelného uhlíku ($d = 3$ mm) firmy Radiometer Analytical SAS (Francie). Rotace pracovní elektrody byla 1226 ot min^{-1} , rychlost polarizace 10 mV s^{-1} . Referenční elektrodou byla Pleskovova elektroda ($\text{Ag}/0,01$ mol l^{-1} $\text{AgNO}_3/1$ mol l^{-1} NaClO_4 v acetonitrilu), oddělená od měřeného roztoku meziprostorem s náplní $0,5$ mol l^{-1} NaClO_4 v acetonitrilu. Pomocnou elektrodou byl platinový plíšek.

Zaznamenání výsledků probíhalo pomocí programu Polar 0.2F (Polaro-Sensors, ČR). Každé měření bylo opakováno nejméně třikrát, prezentované výsledky jsou mediánem z těchto opakovaných měření. Ke zpracování naměřených dat byly použity programy Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) a Microcal Origin 6.0 Professional (Microcal Software, USA), OriginPro 8.1 (Microcal Software, USA).

3 Výsledky a diskuze

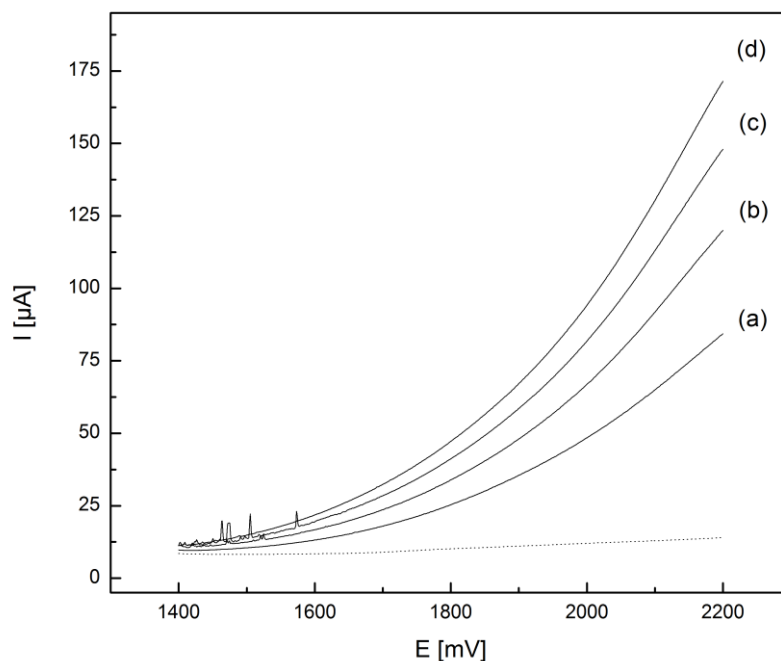
Na základě dostupné literatury (kap. 1.4.2) bylo jako prostředí pro studium elektrochemické oxidace vybraných šesti žlučových kyselin (dehydrocholová, deoxycholová, cholová, lithocholová, tauroursodeoxycholová a ursodeoxycholová kyselina) zvoleno prostředí bezvodého acetonitrilu, jako základní elektrolyt byl použit chloristan sodný. Jako pracovní elektrody byly použity rotující diskové elektrody platinová a ze skelného uhlíku.

Bylo zjištěno, že rozpustnost žlučových kyselin v acetonitrilu za laboratorní teploty je velmi malá, proto byly zásobní roztoky připravovány v methanolu.

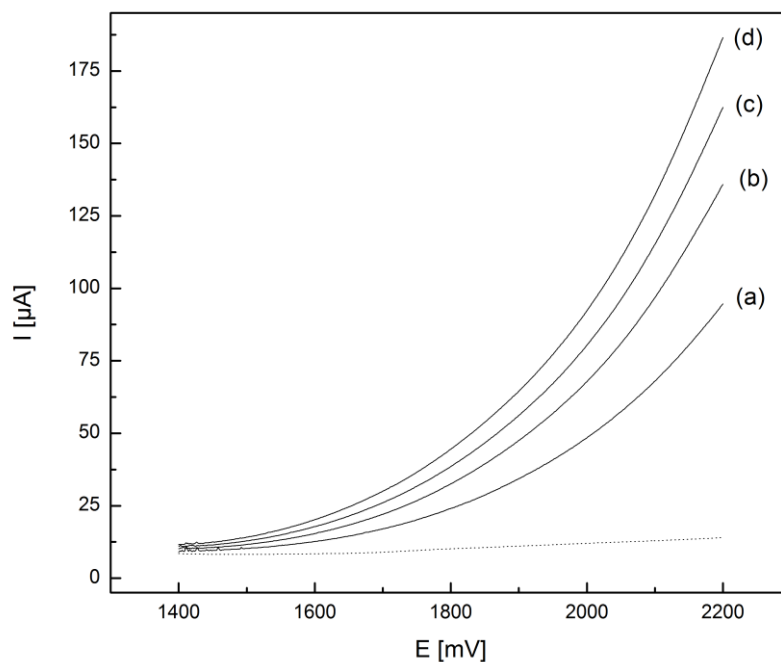
K elektrochemickému studiu byla nejprve použita metoda cyklické voltametrie, při níž se však ukázalo, že naměřené voltamogramy nejsou reprodukovatelné, pravděpodobně z důvodu ulpívání oxidačních produktů žlučových kyselin na povrchu elektrody, proto byla jako metoda zvolena DC voltametrie na rotující diskové elektrodě.

3.1 Voltametrická měření

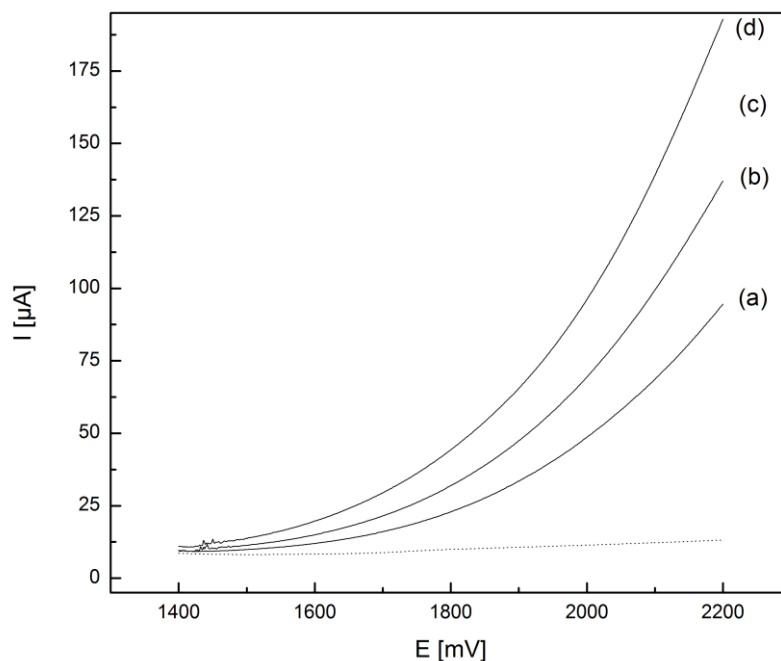
Pro studium elektrochemické oxidace vybraných žlučových kyselin byly vybrány dva různé elektrodové materiály. Naměřené voltamogramy na rotující diskové platinové elektrodě jsou uvedeny na obr. 3.1–3.6. Naměřené voltamogramy na rotující diskové elektrodě ze skelného uhlíku pak na obr. 3.7–3.12.



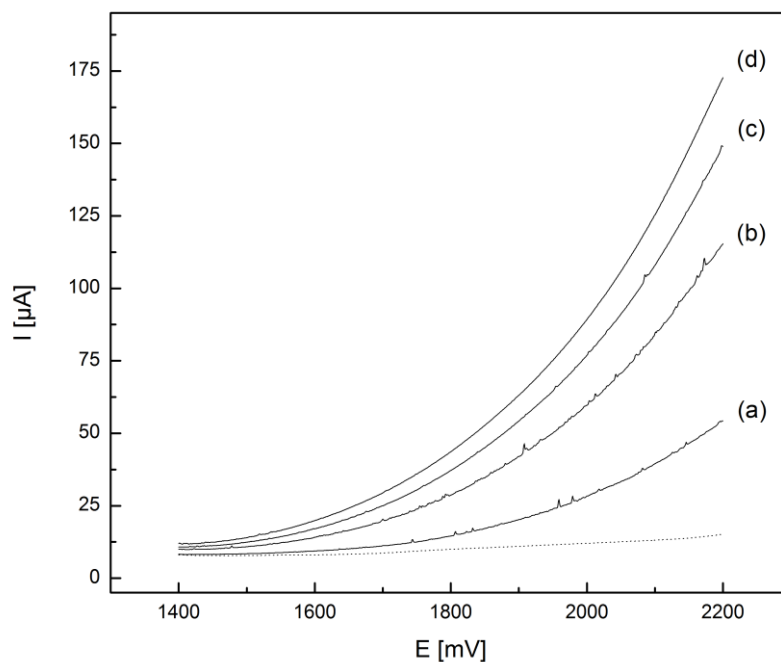
Obr. 3.1 DC voltamogramy dehydrocholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na platinové elektrodě. Koncentrace dehydrocholové kyseliny: (a) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (c) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (d) $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 10 mV s^{-1} , plocha elektrody $3,1 \text{ mm}^2$, 1226 ot min^{-1} , potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.



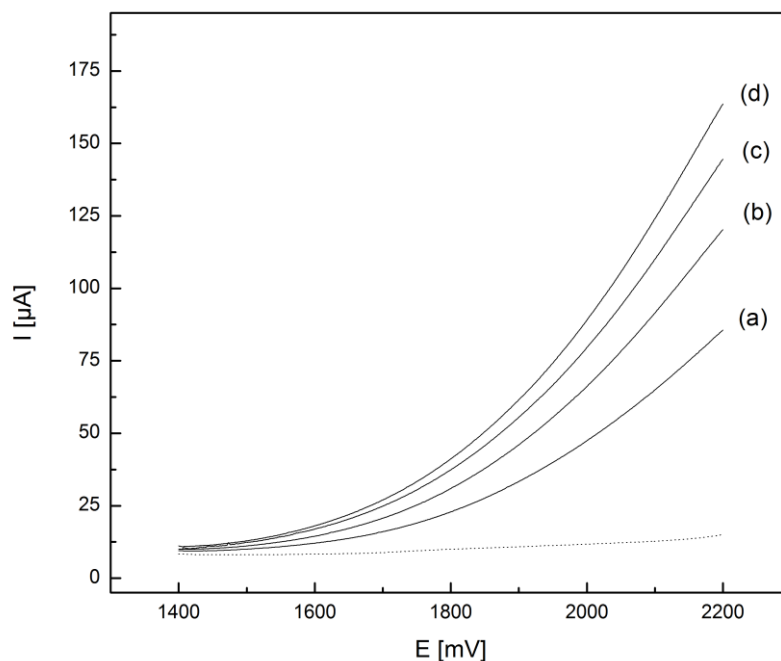
Obr. 3.2 DC voltamogramy deoxycholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na platinové elektrodě. Koncentrace deoxycholové kyseliny: (a) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (c) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (d) $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 10 mV s^{-1} , plocha elektrody $3,1 \text{ mm}^2$, 1226 ot min^{-1} , potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.



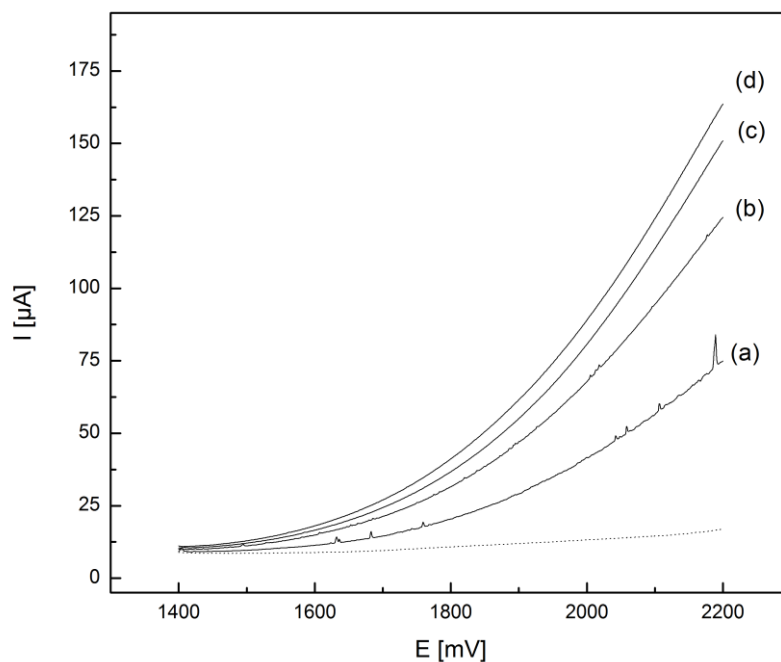
Obr. 3.3 DC voltamogramy cholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na platinové elektrodě. Koncentrace cholové kyseliny: (a) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (c) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (d) $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 10 mV s^{-1} , plocha elektrody $3,1 \text{ mm}^2$, 1226 ot min^{-1} , potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.



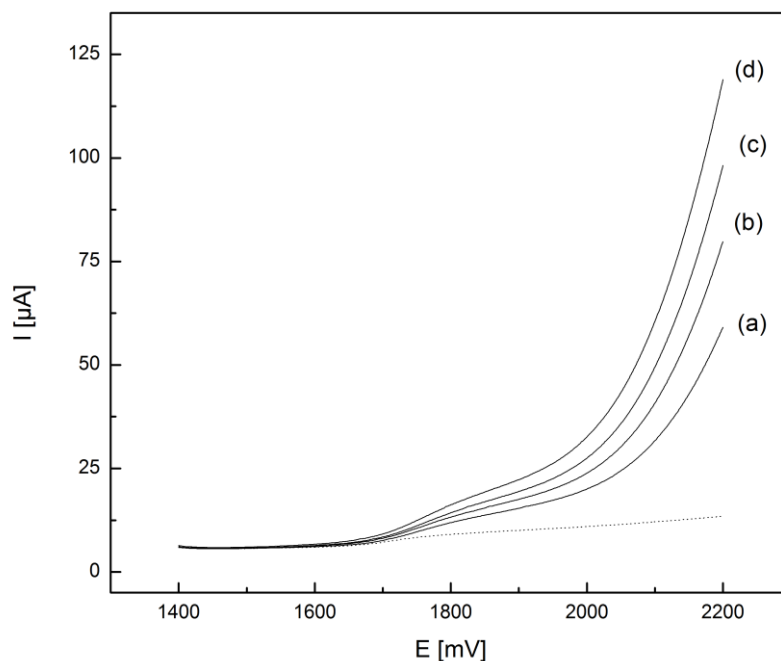
Obr. 3.4 DC voltamogramy lithocholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na platinové elektrodě. Koncentrace lithocholové kyseliny: (a) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (c) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (d) $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 10 mV s^{-1} , plocha elektrody $3,1 \text{ mm}^2$, 1226 ot min^{-1} , potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.



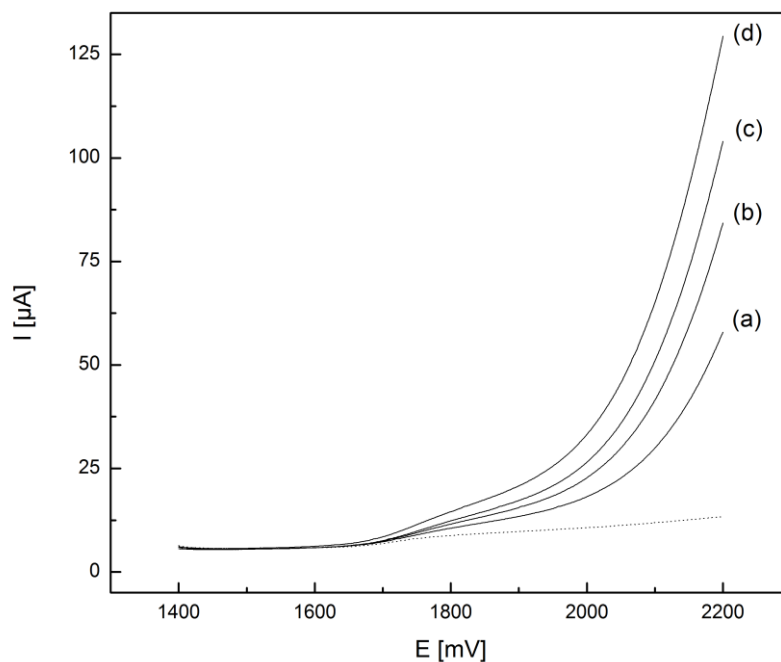
Obr. 3.5 DC voltamogramy tauroursodeoxycholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na platinové elektrodě. Koncentrace tauroursodeoxycholové kyseliny: (a) $5,0 \times 10^{-5}$ mol l^{-1} , (b) $1,0 \times 10^{-4}$ mol l^{-1} , (c) $1,5 \times 10^{-4}$ mol l^{-1} , (d) $2,0 \times 10^{-4}$ mol l^{-1} . Základní elektrolyt 0,1 mol l^{-1} chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 10 mV s^{-1} , plocha elektrody $3,1 \text{ mm}^2$, 1226 ot min^{-1} , potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.



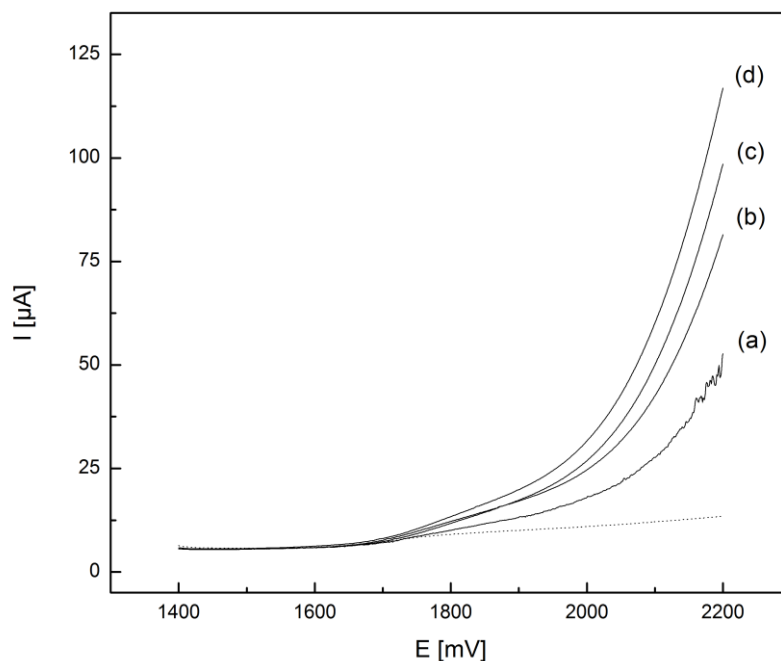
Obr. 3.6 DC voltamogramy ursodeoxycholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na platinové elektrodě. Koncentrace ursodeoxycholové kyseliny: (a) $5,0 \times 10^{-5}$ mol l^{-1} , (b) $1,0 \times 10^{-4}$ mol l^{-1} , (c) $1,5 \times 10^{-4}$ mol l^{-1} , (d) $2,0 \times 10^{-4}$ mol l^{-1} . Základní elektrolyt 0,1 mol l^{-1} chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 10 mV s^{-1} , plocha elektrody $3,1 \text{ mm}^2$, 1226 ot min^{-1} , potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.



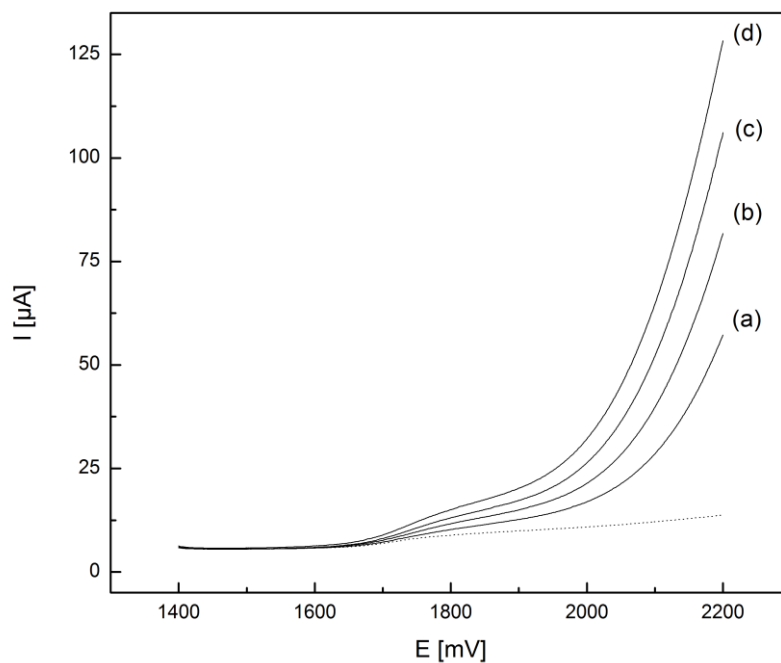
Obr. 3.7 DC voltamogramy dehydrocholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na elektrodě ze skelného uhlíku. Koncentrace dehydrocholové kyseliny: (a) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (c) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (d) $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 10 mV s^{-1} , plocha elektrody $3,1 \text{ mm}^2$, 1226 ot min^{-1} , potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.



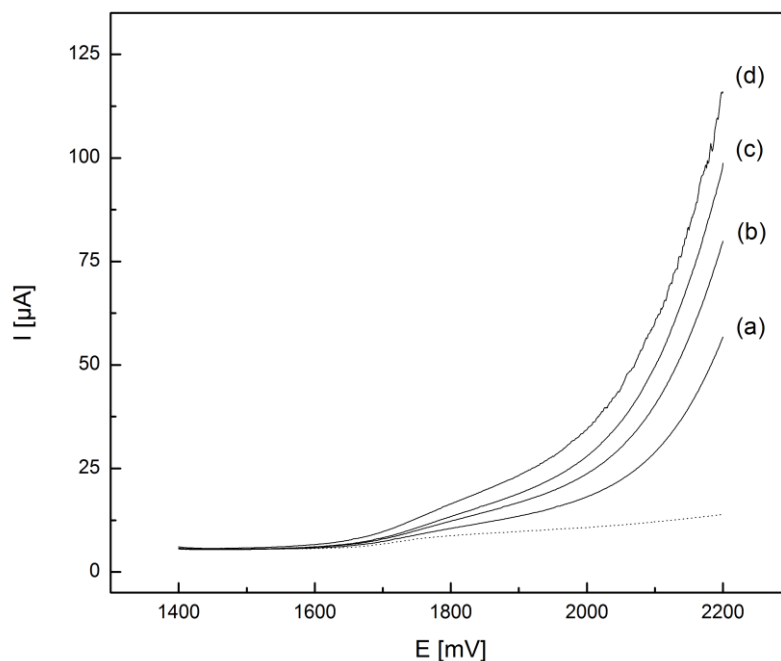
Obr. 3.8 DC voltamogramy deoxycholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na elektrodě ze skelného uhlíku. Koncentrace deoxycholové kyseliny: (a) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (c) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (d) $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 10 mV s^{-1} , plocha elektrody $3,1 \text{ mm}^2$, 1226 ot min^{-1} , potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.



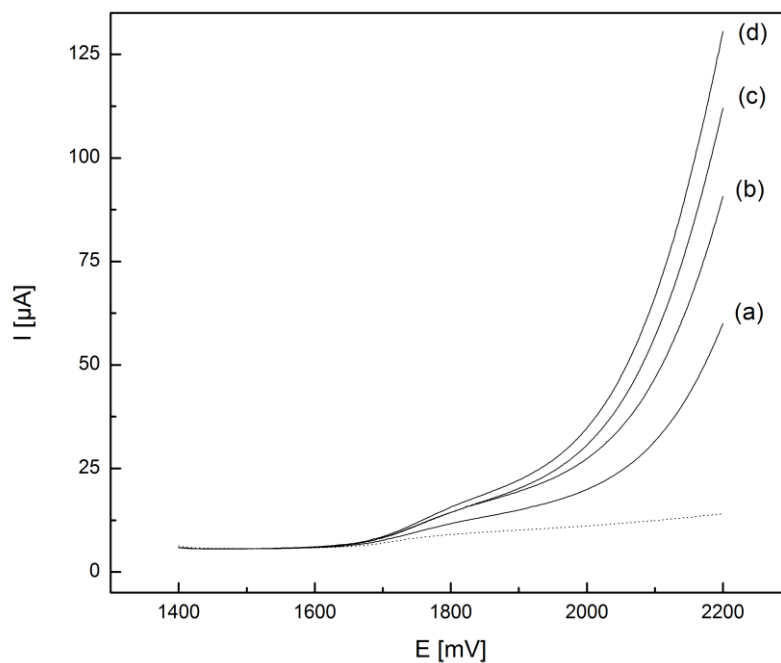
Obr. 3.9 DC voltamogramy cholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na elektrodě ze skelného uhlíku. Koncentrace cholové kyseliny: (a) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (c) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (d) $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 10 mV s^{-1} , plocha elektrody $3,1 \text{ mm}^2$, 1226 ot min^{-1} , potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.



Obr. 3.10 DC voltamogramy lithocholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na elektrodě ze skelného uhlíku. Koncentrace lithocholové kyseliny: (a) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (c) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (d) $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 10 mV s^{-1} , plocha elektrody $3,1 \text{ mm}^2$, 1226 ot min^{-1} , potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.



Obr. 3.11 DC voltamogramy tauroursodeoxycholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na elektrodě ze skelného uhlíku. Koncentrace tauroursodeoxycholové kyseliny: (a) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (c) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (d) $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 10 mV s^{-1} , plocha elektrody $3,1 \text{ mm}^2$, 1226 ot min^{-1} , potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.



Obr. 3.12 DC voltamogramy ursodeoxycholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na elektrodě ze skelného uhlíku. Koncentrace ursodeoxycholové kyseliny: (a) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (c) $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (d) $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 10 mV s^{-1} , plocha elektrody $3,1 \text{ mm}^2$, 1226 ot min^{-1} , potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.

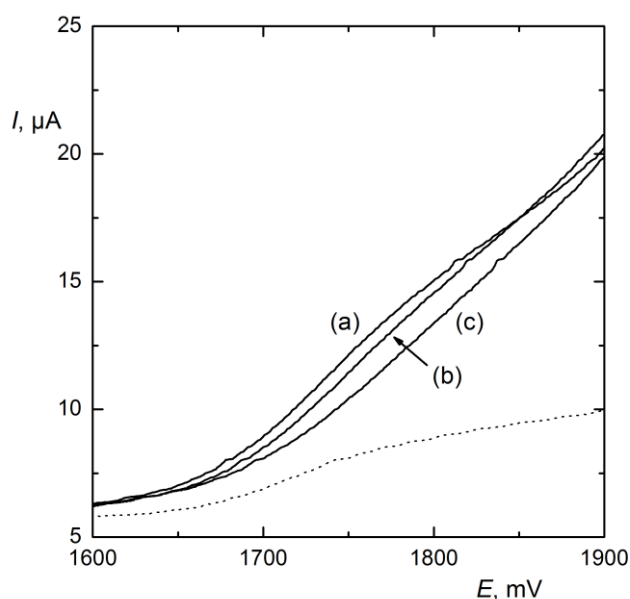
3.2 Diskuze

Z naměřených dat vyplývá, že platinová elektroda není pro stanovení žlučových kyselin oxidací vhodná, což je v souladu s literaturou, kde se kovová (zlatá) elektroda také ukázala jako ne příliš vhodná [13]. Voltametrické vlny získané na této elektrodě jsou velmi táhlé a nelze z nich odečíst ani půlvalnový potenciál ani limitní konvektivně-difuzní proud.

Voltametrické vlny naměřené na elektrodě ze skelného uhlíku byly již mnohem lépe vyvinuté a bylo z nich možné odečíst obě voltametrické charakteristiky. Půlvalnové potenciály byly odečteny pomocí derivace voltametrické vlny při koncentraci kyseliny $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Zjištěné hodnoty jsou shrnuty v tab. 3.1. Jak je ovšem patrné, hodnoty půlvalnových potenciálů jednotlivých kyselin jsou velmi podobné, v rozsahu 45 mV (ilustrováno na obr 3.13), a bez další optimalizace není tedy tuto metodu možné použít pro přímou identifikaci žlučových kyselin a je nutné použít předchozí separační krok, například HPLC.

Tab. 3.1 Půlvalnové potenciály studovaných žlučových kyselin na elektrodě ze skelného uhlíku v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristanu sodného v acetonitrilu (potenciál proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$).

kyselina	$E_{1/2}$, mV
dehydrocholová kyselina	1760
deoxycholová kyselina	1760
cholová kyselina	1780
litocholová kyselina	1735
tauroursodeoxycholová kyselina	1750
ursodeoxycholová kyselina	1760

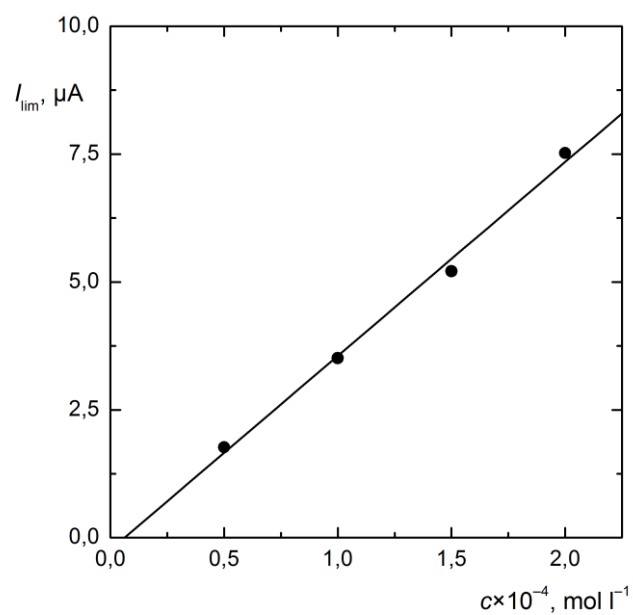


Obr. 3.13 Porovnání DC voltamogramů (a) lithocholové kyseliny, (b) deoxycholové kyseliny a (c) cholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na elektrodě ze skelného uhlíku. Koncentrace všech kyselin $2,0 \times 10^{-4}$ mol Γ^{-1} , základní elektrolyt 0,1 mol Γ^{-1} chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 10 mV s^{-1} , plocha elektrody 3,1 mm², 1226 ot min^{-1} , potenciál měřen proti Ag/0,01 mol Γ^{-1} AgNO₃/1 mol Γ^{-1} NaClO₄.

Koncentrační závislosti limitního konvektivně-difuzního proudu bylo, jak je uvedeno výše, možné odečíst pouze u měření provedených na elektrodě ze skelného uhlíku. Získané rovnice kalibrační přímky jsou uvedeny v tab. 3.2. Na obr. 3.14 je pro ilustraci uvedena kalibrační závislost pro lithocholovou kyselinu. Jak je patrné z hodnot korelačních koeficientů, linearita kalibračních závislostí je v některých případech zhoršena. Obtížnost odečítání limitního konvektivně-difuzního proudu může souviset se sorpcí produktů elektrooxidace na povrch elektrody; proto by bylo vhodné v budoucnosti elektrodu mezi jednotlivými měřeními čistit účinnějším způsobem, než pouhým otřením buničinou.

Tab. 3.2 Rovnice kalibračních přímek pro stanovení studovaných žlučových kyselin DC voltametří na skelném uhlíku v prostředí acetonitrilu a příslušné regresní koeficienty.

kyselina	rovnice kalibrační přímky	R
dehydrocholová	$I_{lim} [\mu A] = 34000 \times c [mol \Gamma^{-1}] + 1,9$	0,9948
deoxycholová	$I_{lim} [\mu A] = 31000 \times c [mol \Gamma^{-1}]$	0,9771
cholová	$I_{lim} [\mu A] = 26000 \times c [mol \Gamma^{-1}]$	0,9189
lithocholová	$I_{lim} [\mu A] = 38000 \times c [mol \Gamma^{-1}] - 0,2$	0,9972
tauroursodeoxycholová	$I_{lim} [\mu A] = 31000 \times c [mol \Gamma^{-1}] - 0,4$	0,9771
ursodeoxycholová	$I_{lim} [\mu A] = 30000 \times c [mol \Gamma^{-1}] - 2$	0,9184



Obr. 3.14 Závislost limitního konvektivně-difuzního proudu na koncentraci při stanovení lithocholové kyseliny DC voltametří v prostředí acetonitrilu na elektrodě ze skelného uhlíku. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný, rychlost polarizace 10 mV s^{-1} , plocha elektrody $3,1 \text{ mm}^2$, 1226 ot min^{-1} .

4 Závěr

Tato bakalářská práce si kladla za cíl vyhodnotit vhodnost elektrodoých materiálů pro přímou oxidaci vybraných žlučových kyselin v prostředí acetonitrilu. Byla použita metoda DC voltametrie. Byly využity dva elektrodoé materiály, platinová elektroda a elektroda ze skelného uhlíku.

Bylo zjištěno, že platina není vhodným materiálem pro oxidaci žlučových kyselin v prostředí acetonitrilu, protože získané voltamogramy nelze vyhodnotit.

Elektroda ze skelného uhlíku se ukázala jako vhodnější, z dat na ní naměřených bylo možné určit půlvolnové potenciály jednotlivých žlučových kyselin. Potenciály jsou však velice podobné, dokonce i ve třech případech stejné, a proto by byla identifikace jednotlivých kyselin ve směsi velmi těžká, ne-li nemožná. Pro účely identifikace žlučových kyselin není proto tato metoda v současné podobě vhodná a je nutné ji spojit se separačním krokem. Stanovení žlučových kyselin na GCE je možné za předpokladu kvalitního čištění povrchu elektrody od oxidačních produktů mezi jednotlivými měřeními.

Literatura

- [1] Hofmann A.F., Hagey L.R.: Bile acids: Chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci.* **65** (2008), 2461–2483.
- [2] Cabral D. J., Small D.M.: Physical chemistry of bile. In: *Handbook of Physiology. The Gastrointestinal System*. S.G. Schultz, J.G. Forte, B.B. Rauner (eds.). American Physiological Society, Bethesda 1989, p. 621–662.
- [3] Carey M.C.: Physical-chemical properties of bile acids and their salts. In: *Sterols and Bile Acids*. H. Danielsson, J. Sjövall (eds.). Elsevier, Amsterdam 1985, p. 345–404.
- [4] Hofmann A.F., Mysels K.J.: Bile acid solubility and precipitation *in vitro* and *in vivo*. The role of conjugation, pH, and Ca^{2+} ions. *J. Lipid Research* **33** (1992), 617–626.
- [5] Roda A., Hofmann A.F., Mysels K.J.: The influence of bile salt structure on self-association in aqueous solutions. *J. Biol. Chem.* **258** (1983), 6362–6370.
- [6] Hofmann A.F., Roda A.: Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *J. Lipid Res.* **25** (1984), 1477–1489.
- [7] Patel M.D., Thompson P.D.: Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis* **186** (2006), 12–19.
- [8] Scalia S.: Bile acid separation. *J. Chromatogr. B* **671** (1995), 299–317.
- [9] Griffiths W.J., Sjövall J.: Bile acids. Analysis in biological fluids and tissues. *J. Lipid Res.* **51** (2010), 23–41.
- [10] Griffiths W.J., Sjövall J.: Analytical strategies for characterization of bile acid and oxysterol metabolomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396** (2010), 80–84.
- [11] Scalia S.: Simultaneous determination of free and conjugated bile acids in human gastric juice by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* **431** (1988), 259–269.

- [12] Sergi M., Montesano C., Napoletano S., Pizzoni D., Manetti C., Colistro F., Curini R., Compagone D.: Analysis of bile acids profile in human serum by ultrafiltration clean-up and LC-MS/MS. *Chromatographia* **75** (2012), 479–489.
- [13] Pecková K., Nesměrák K.: Electrochemistry of bile acids, cholesterol, and related compounds. In: *Sensing in Electroanalysis. Vol. 7*. K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytrás (Eds.). Pardubice, University Press Centre 2012, p. 87–96.
- [14] Ferri T., Campanella L., Deangelis G.: Differential-pulse polarographic determination of cholic acids. *Analyst* **109** (1984), 923–925.
- [15] Luo H.-X., Shi Z.-J., Li N.-Q., Gu Z.-N., Zhuang Q.-K.: Investigation of the electrochemical and electrocatalytic behavior of single-wall carbon nanotube film on a glassy carbon electrode. *Anal. Chem.* **73** (2001), 915–920.
- [16] Hojo K., Hakamata H., Ito A., Kotani A., Furukawa C., Hosokawa Y.-Y., Kusu F.: Determination of total cholesterol in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chrom. A* **1166** (2007), 135–141.
- [17] Hojo K., Hakamata H., Ito A., Kotani A., Takahashi A., Hosokawa Y.-Y., Kusu F.: Determination of serum cholestanol by semi-micro high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Biomed. Chromatogr.* **24** (2010), 600–605.
- [18] Hojo K., Hakamata H., Kusu F.: Simultaneous determination of serum lathosterol and cholesterol by semi-micro high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chrom. B* **879** (2011), 751–755.
- [19] Kotani A., Hakamata H., Nakayama N., Kusu F.: Picomole level determination of cholesterol by HPLC with electrochemical detection using boron-doped diamond electrode after performance assessment based on the FUMI theory. *Electroanalysis* **23** (2011), 2709–2715.
- [20] Matsunaga I., Hakamata H., Sadohara K., Kakiuchi K., Kusu F.: Determination of oxysterols in oxidatively modified low-density lipoprotein by semi-micro high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Biochem.* **393** (2009), 222–228.

-
- [21] Ito N., Hakamata H., Kusu F.: Simultaneous determination of β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, and brassicasterol in serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Methods* **2** (2010), 174–179.
- [22] Medici A., Pedrini P., De Battisti A., Fantin G., Fogagnolo M., Guerrini A.: Anodic electrochemical oxidation of cholic acid. *Steroids* **66** (2001) 63-69
- [23] Bonfatti F., De Battisti A., Ferro S., Medici A., Pedrini P.: Electrosynthesis of dehydrocholic acid from cholic acid. *J. Appl. Electrochem.* **30** (2000), 995–998.