

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Jan Klouda

ELEKTROCHEMICKÁ OXIDACE ŽLUČOVÝCH KYSELIN
NA ELEKTRODÁCH NA BÁZI UHLÍKU. MOŽNOSTI VYUŽITÍ
V ELEKTROANALÝZE.

ELECTROCHEMICAL OXIDATION OF BILE ACIDS ON CARBON BASED
ELECTRODES. THE POSSIBLE USE IN ELECTROANALYSIS.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Karolina Schwarzová, Ph.D.

Praha 2015

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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou 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 20.8. 2015

Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo prostudovat možnost elektrochemické oxidace sedmi vybraných žlučových kyselin a vyhodnotit vhodnost těchto procesů pro analytickou aplikaci. Sekundárním cílem bylo popsat produkty elektrolyzy žlučových kyselin. Měření probíhala v nevodném prostředí acetonitrilu a ve směsném prostředí acetonitril:voda za použití linear sweep a cyklické voltametrie na pracovních elektrodách z vysoce orientovaného pyrolytického grafitu, β -cyklodextrinem zmodifikované elektrodě ze skelného uhlíku a borem dopované diamantové elektrodě. Preparativní elektrolyza proběhla na platinové elektrodě, taktéž v nevodném prostředí acetonitrilu. Měření ukázala, že ani elektroda z vysoce orientovaného pyrolytického grafitu, ani β -cyklodextrinem zmodifikovaná elektroda ze skelného uhlíku nejsou za zvolených podmínek pro analytickou aplikaci vhodné. Na borem dopované diamantové elektrodě bylo dosaženo výsledků v literatuře dosud nepopsaných. Ve směsném prostředí acetonitril:voda se primární žlučové kyseliny cholová a chenodeoxycholová oxidovaly při přibližně o 0,5 V nižším potenciálu, než v dodnes publikovaných pracích na uhlíkových elektrodách. Produkty oxidace na platinové elektrodě byly separovány pomocí TLC a charakterizovány pomocí UV a IČ spektrometrie, avšak pro jejich plnou identifikaci bude třeba provést další analýzy.

Klíčová slova

žlučové kyseliny, voltametrie, elektrodové materiály, preparativní elektrolyza

Abstract

The goal of this master's thesis was to examine the possibility of oxidation of seven selected bile acids and evaluate whether such processes are suitable for analytical purposes. The secondary goal was to describe the oxidation products of bile acid electrolysis. The experiments were carried out in a non-aqueous medium of acetonitrile and in a mixed medium of acetonitrile:water using linear sweep and cyclic voltammetry. The working electrode materials employed for voltammetric experiments were: highly oriented pyrolytic graphite, β -cyclodextrin modified glassy carbon and boron doped diamond. Preparative electrolysis was carried out on a platinum electrode in the non-aqueous medium of acetonitrile. Experiments have shown that neither the highly oriented pyrolytic graphite electrode nor the β -cyclodextrin modified glassy carbon electrode are suitable for analytical purposes under conditions used. The results achieved on the boron doped diamond electrode, on the other hand, have not yet been described in the literature. Primary bile acids cholic and chenodeoxycholic were oxidized at approximately 0.5 V lower potential in the mixed medium of acetonitrile:water than in the papers using carbon electrodes published until now. Products of oxidation on the platinum electrode were separated by TLC and characterized by UV and IR spectrometry. Nevertheless, further analyses need to be carried out for the full identification of the products.

Key words

bile acids, voltammetry, electrode materials, preparative electrolysis

Poděkování

Rád bych velmi poděkoval svému školiteli, panu doktoru Nesměrákovi, za pomoc při provádění experimentů a cenné rady, díky kterým se tvůrčí činnost ubírala správným směrem. Paní doktorce Schwarzové děkuji za konzultace, bez kterých by má diplomová práce nemohla vzniknout v předkládané podobě. Oběma pak patří velký dík za ty letní dny a noci, které věnovali pročtení práce. Díky patří také pánům doktorům Schwarzovi a Dračínskému za provedení IČ a NMR analýz. Kristině Petříčkové, Petře Kloudové a Lence Honesové moc děkuji za pomoc s korekturou textu a za užitečné připomínky. Největší dík však patří mým rodičům za vytrvalou podporu, díky které bylo studium na vysoké škole krásnou částí mého života.

Obsah

Seznam zkratek	8
1 Teoretická část	9
1.1 Úvod	9
1.2 Použité elektrodové materiály	10
1.2.1 Borem dopovaný diamant	10
1.2.2 Vysoce orientovaný pyrolytický grafit	14
1.2.3 Skelný uhlík	14
1.2.4 Platina	15
1.3 Cyklodextriny	15
1.3.1 Cyklodextriny jako elektrodové modifikátory	16
1.3.2 Cyklodextriny a žlučové kyseliny	17
1.4 Žlučové kyseliny	18
1.4.1 Struktura žlučových kyselin	19
1.4.2 Biochemie žlučových kyselin	20
1.4.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti žlučových kyselin	21
1.5 Analytická chemie žlučových kyselin	24
1.6 Elektrochemické vlastnosti žlučových kyselin	25
1.6.1 Redukce žlučových kyselin	26
1.6.2 Oxidace žlučových kyselin	26
2 Experimentální část	30
2.1 Studované látky	30

2.2	Použité chemikálie.....	30
2.3	Metody měření a zpracování dat	30
2.3.1	Voltametrie na elektrodě z HOPG	31
2.3.2	Voltametrie na GCE modifikované β -cyklodextrinem.....	32
2.3.3	Voltametrie na BDDE.....	33
2.3.4	Preparativní elektrolýza na platinové elektrodě.....	35
2.3.5	Spektrofotometrická měření.....	36
2.3.6	Tenkvrstvá chromatografie	36
2.3.7	Infračervená spektrometrie	37
2.3.8	Nukleární magnetická rezonance	37
3	Výsledky a diskuze	38
3.1	Voltametrie na HOPG	38
3.2	Voltametrie na β -cyklodextrinem modifikované GCE.....	39
3.3	Voltametrie na BDDE	41
3.3.1	Vliv methanolu a vody na šíři potenciálového okna na BDDE	42
3.3.2	Anodická a katodická předpříprava a aktivace elektrodového povrchu BDDE	44
3.3.3	Měření ve směsných prostředích acetonitril:voda na BDDE.....	48
3.4	Preparativní elektrolýza na platinové elektrodě	57
4	Závěr	61
	Literatura	64

Seznam zkratek

BDD	borem dopovaný diamant
c	molární koncentrace [mol l^{-1}]
CD	cyklodextriny
CMC	kritická micelární koncentrace
E	potenciál [mV]
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
HOPG	vysoce orientovaný pyrolytický grafit
I	proud [μA]
LS	<i>linear scan</i>
n	počet vyměňovaných elektronů

1 Teoretická část

1.1 Úvod

Cílem této práce je prostudovat možnosti analytického využití elektrochemické oxidace žlučových kyselin na vybraných elektrodových materiálech. Sekundárním cílem je charakterizace vlastností a identifikace oxidačních produktů žlučových kyselin.

Možnosti oxidace žlučových kyselin na platinové elektrodě a elektrodě ze skelného uhlíku byly popsány v mé bakalářské práci, v níž byla možnost elektrochemické oxidace na těchto materiálech v nevodném prostředí potvrzena [1]. Diplomová práce je věnována možnostem oxidace na dalších elektrodových materiálech (borem dopovaný diamant, vysoce orientovaný pyrolytický grafit) v různých prostředích, na modifikovaných elektrodách (skelný uhlík modifikovaný β -cyklodextrinem) a také popisu produktů elektrochemické oxidace na platinové elektrodě. Produkty preparativní elektrolýzy na platinové elektrodě byly analyzovány metodami nukleární magnetické rezonance, ultrafialové a infračervené spektrometrie a tenkovrstvé chromatografie.

Teoretická část je věnována především shrnutí dosavadních poznatků o elektrodových materiálech, které byly v práci použity, cyklodextrinům, které byly využity jako elektrodové modifikátory, a shrnutí základních vlastností žlučových kyselin.

Tato diplomová práce je součástí širšího výzkumného projektu, který je věnován studiu elektrochemických vlastností přírodních steroidních sloučenin (např. žlučových kyselin, fytosterolů). Ty mohou být využity pro charakterizaci jejich vzájemných supramolekulárních interakcí a interakcí konjugátů, které se z těchto molekul připravují. Součástí projektu je i studium možností využití elektrochemické oxidace a redukce steroidních sloučenin v elektroanalýze.

1.2 Použité elektrodové materiály

V této práci byly použity čtyři typy elektrodových materiálů, ve třech případech obsahovaly materiál na bázi uhlíku, pro preparativní oxidaci byla použita platinová elektroda. Byly použity následující elektrody na bázi uhlíku: borem dopovaná diamantová elektroda, na které proběhla většina měření, dále pak elektroda z vysoce orientovaného pyrolytického grafitu a elektroda ze skelného uhlíku.

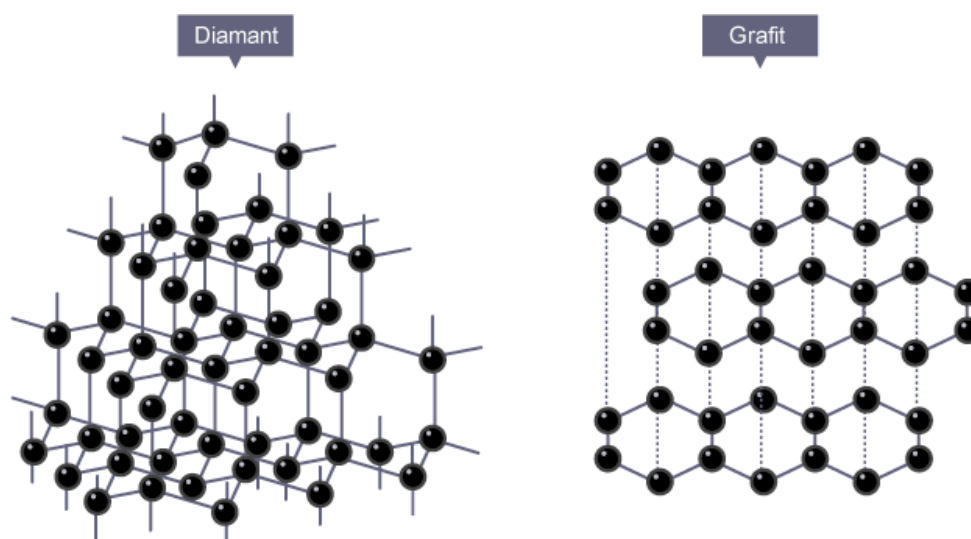
1.2.1 Borem dopovaný diamant

Éra diamantových elektrod započala v osmdesátých letech 20. století. Od té doby prošly významným vývojem a jejich využití se různí od elektrosyntézy, přes elektroanalýzu, použití v Li-ionových bateriích a palivových článcích až po diamantové biosensory. Jako elektrodový materiál je borem dopovaný diamant (BDD) používán relativně krátce, populární začal být až začátkem devadesátých let 20. století [2]. Elektroanalýza organických sloučenin na BDD elektrodách byla pak poprvé navržena roku 1993 [3]. Jejich vlastnosti jsou přehledně shrnuty v review Peckové et al. z roku 2009 [4]. Další přehledné články se zabývají obecnými elektrochemickými vlastnostmi [5], modifikacemi elektrodového povrchu [6] a elektroanalytickými aplikacemi [7–11] BDD. Zároveň také vyšla dvě ucelená review [12, 13] a kniha zaměřená na elektrochemii diamantu [14]. Nejnovější review zabývající se tématem diamantových elektrod vyšlo v roce 2014 [15].

Diamant je jako extrémně tvrdá krystalická forma uhlíku využíván pro své chemické a fyzikální vlastnosti. Mezi ně se řadí vysoký elektrický odpor, velká tepelná vodivost a chemická inertnost [3]. Nedopovaný syntetický diamant bez nečistot se chová jako elektrický izolant s měrným odporem větším než $10^8 \Omega \text{ cm}$, s energií zakázaného pásu 5,4–5,7 eV. Pokud je diamant dopovaný borem, měrný odpor se může snížit až na $0,01 \Omega \text{ cm}$. Bor, který má ve své valenční vrstvě o jeden elektron méně než uhlík, se po přidání do diamantové mřížky chová jako akceptor elektronů, který tvoří vodivý pás přibližně 0,35 eV nad hranou valenčního pásu a dává vzniklému materiálu

vlastnosti p-polovodiče [16]. V závislosti na koncentraci dopantu může diamant získat vlastnosti až polokovové [17].

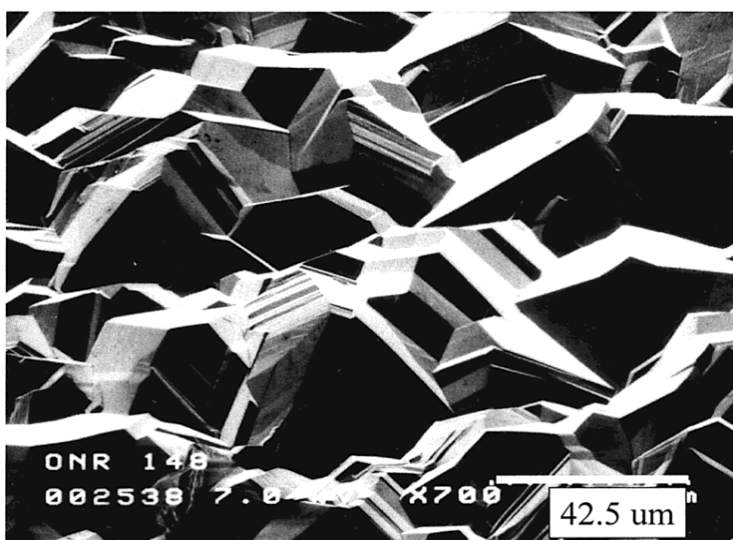
Strukturně je diamant kubická mřížka složená z sp^3 hybridizovaných tetraedicky uspořádaných uhlíkových atomů, kdy je každý atom vázán na čtyři další uhlíky [3]. Sekvence vrstev je ABCABC, každá třetí vrstva je tedy identická. Tato struktura se zásadně liší od ostatních uhlíkových elektrodoých materiálů (skelný uhlík, grafit), které se skládají z vrstev kondenzovaných polyaromatických sp^2 hybridizovaných kruhů s každým uhlíkovým atomem navázaným na tři sousedící atomy, přičemž zbývající p orbitaly tvoří systém delokalizovaných π elektronů, které zajišťují elektrickou vodivost. Jednotlivé sp^2 materiály se od sebe liší především velikostí a uspořádáním krystalických domén. Jejich povrch je nehomogenní a obsahuje množství funkčních skupin, především karbonylových a hydroxylových [17]. Karbonylové skupiny u sp^2 uhlíkových elektrod pomáhají zprostředkovávat elektronový přenos [18]. Sekvence vrstev je u grafitu ABAB, kdy je každá druhá vrstva identická. Struktura diamantu i grafitu je znázorněna na obr. 1.1.



Obr. 1.1 Znázornění struktury diamantu a grafitu. Obrázek dostupný online z: <http://a.files.bbci.co.uk/bam/live/content/zn46yrd/>.

Borem dopované diamantové filmy jsou buď komerčně dostupné a nebo je možné je připravit v laboratorních podmínkách [19]. BDD filmy jsou připravovány jednou z metod chemické depozice par, kdy se deponují na křemíkový základ ze směsi

uhlovodíkového plynu (typicky methanu), vodíku a diboranu, který slouží jako zdroj boru [4, 20]. Před depozicí je nutné páry vhodně aktivovat, k tomu se nejčastěji používá žhavené vlákno nebo mikrovlnná plazma. Běžné podmínky vzniku BDD filmů jsou následující: C/H poměr 0,5–2%, tlak 10–150 torr, teplota 700–1000 °C a mikrovlnný výkon 1000–1300 W nebo teplota žhaveného vlákna 2400–2800 °C. Rychlost růstu filmu se pohybuje v řádu desetin až jednotek mikrometrů za hodinu. Odpor takto připravovaných filmů se pohybuje okolo 0,1 Ω cm [21].

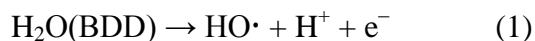


Obr. 1.2 Obrázek vysoce kvalitního diamantového filmu získaný za pomoci skenovací elektronové mikroskopie. Převzato z [18].

Borem dopovaný diamant je v analytické elektrochemii nejčastěji využíván ve formě tenkých polykrystalických filmů (obr 1.2) [17]. Povrch těchto filmů je po přípravě terminovaný vodíkem (H-terminace), je však možné ho zoxidovat (O-terminace) a známy jsou i terminace dalšími prvky. Z elektroanalytického hlediska patří ve srovnání s ostatními uhlíkovými elektrodovými materiály mezi důležité vlastnosti BDD mechanická i chemická stabilita, nízký zbytkový proud a biokompatibilita [20]. Dále pak také široké potenciálové okno, které, závisejíc na kvalitě filmu, dosahuje nejčastěji hodnot kolem 3,5 V v neutrálních a kyselých vodných roztocích, při vysoké kvalitě filmu však až 4,4 V [18]. Díky těmto vlastnostem umožňují BDD elektrody provádět elektrochemické reakce při potenciálech, které jsou jinak běžně nedosažitelné, zvláště pak v anodické oblasti. Borem dopované diamantové

elektrody nabízejí vícero vhodných vlastností pro organickou analýzu, lze mezi ně zařadit například menší náchylnost vůči ireverzibilní adsorpci analytu (či dalších složek měřeného vzorku) na povrch elektrody. Ireverzibilní adsorpce je poměrně běžným problémem u elektrod z jiných uhlíkových materiálů, protože vede k jejich pasivaci [20]. Důvodem je již zmíněná rozdílná hybridizace uhlíku, většina elektrod obsahujících uhlík s sp^2 hybridizací je díky přítomnosti polárních skupin na svém povrchu k pasivaci více náchylná, avšak sp^3 diamant je vůči ní naopak značně rezistentní.

Významný vliv na elektrochemické vlastnosti povrchu BDD a jeho využití v elektroanalýze má terminace povrchu. O-terminace může vést ke zvýšení selektivity borem dopovaných diamantových elektrod, či usnadní další modifikace [22]. Jednoduchá elektrochemická oxidace povrchu BDD a nízká náchylnost zoxidovaného povrchu k adsorpci byla prezentována v roce 2000 [23]. Povrch BDD elektrody byl i zmodifikován, a to karboxylovými [24] a amino skupinami [25]. O-terminované BDD filmy mají na rozdíl od H-terminovaných hydrofilní charakter a zároveň také vykazují nižší vodivost. Jak O-terminovaného, tak H-terminovaného povrchu lze dosáhnout katodickou či anodickou předpřípravou elektrody ve vodném roztoku elektrolytu [26]. Při vložení dostatečného anodického potenciálu dochází k rozkladu vody podle rovnice:



Vznikající radikály jsou zodpovědné jednak za oxidaci povrchu BDD filmu, vedoucí k jeho O-terminaci, jednak mohou být mediátorem pro oxidaci látek, jejichž oxidace by byla na jiných elektrodových materiálech nedosažitelná [24]. Obdobně H-terminace lze dosáhnout vložением záporného potenciálu v oblasti vývoje vodíku. Takto získaná H-terminace je však do značné míry nestabilní, dochází totiž k postupné oxidaci povrchu vzdušným kyslíkem.

Diamantové filmy je možno charakterizovat za pomoci Ramanovy spektrometrie, kde poskytují charakteristický pás při 1332 cm^{-1} [28]. Přítomnost nediamantových uhlíkových forem se pak projeví mezi $1500\text{--}1600 \text{ cm}^{-1}$.

1.2.2 Vysoce orientovaný pyrolytický grafit

Vysoce orientovaný pyrolytický grafit (HOPG) je poměrně inertní, dobře strukturně definovaná forma uhlíku, používaná jako elektrodový materiál s minimální katalytickou aktivitou [29]. Vysoce orientovaný pyrolytický grafit se skládá z vrstev hexagonálně uspořádaných sp^2 uhlíkových atomů, jak je ilustrováno pro grafit na obr. 1.1. V rámci jedné vrstvy, která se nazývá bazální vrstva, jsou atomy silně vázány, avšak vazby mezi vrstvami, kde se jedná především o van der Waalovy síly, jsou výrazně slabší. Díky tomu je možné postupně odstraňovat jednotlivé vrstvy a obnovovat tak elektrodový povrch. Pyrolytický grafit vzniká žháním pyrolytického uhlíku, materiálu připravovaného rozkladem uhlovodíkových plynů na rozžhaveném povrchu při teplotě okolo 2500 K. Dalším tepelným zpracováním za zvýšeného tlaku pak při teplotách přes 3000 K vzniká vysoce orientovaný pyrolytický grafit. Ten má úhlové rozpětí c-os (kolmých na bazální vrstvy) jednotlivých krystalků menší než jeden stupeň, a to mu dává strukturu podobnou monokrystalu [30]. Jediná monoatomární dvourozměrná vrstva takto uspořádaných uhlíkových atomů se nazývá grafen nebo grafenový nanolist, který může být „sbalen“, aby vytvořil jednorozměrné uhlíkové nanotrubicе [31]. Pokud je na sobě více než jedna a méně než deset těchto vrstev, takto definovaný materiál se pak nazývá grafenovou nanodestičkou. Pokud je vrstev více než deset, jedná se pak o trojrozměrný grafit.

1.2.3 Skelný uhlík

Skelný uhlík (GCE) je materiál v elektrochemii dlouho a široce používaný. Jedná se o prakticky nepórovitý materiál tvořený amorfním uhlíkem, který je na rozdíl od grafitu tvrdý a strukturně izotropní [30]. Materiál je připravován zahříváním polyakrylonitrilu nebo fenolové pryskyřice na teplotu mezi 1300 až 3300 K. Poskytuje poměrně široké anodické okno a často je používán jako základ pro elektrody s modifikovaným povrchem, díky čemuž byl zvolen pro použití v této práci [32]. Více o modifikaci GCE je uvedeno v kapitole 1.3.

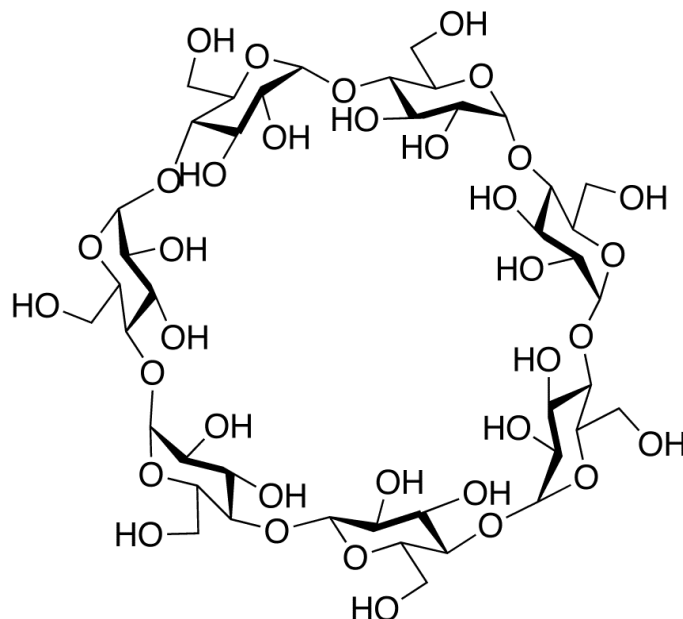
1.2.4 Platina

Platinové elektrody se řadí mezi elektrody kovové a spolu se zlatými jsou v této kategorii používány nejčastěji [30]. Platinové elektrody se obecně vyznačují vysokou rychlostí přenosu náboje a poskytují relativně široké anodické potenciálové okno. Katodické je pak, na platině zejména, limitováno vývojem vodíku. Dále u kovových elektrod pozorujeme oproti uhlíkovým vyšší proud pozadí, což je způsobeno oxidací jejich povrchu, adsorpcí a desorpcí H^+ a dalších iontů. Díky svým elektrochemickým a mechanickým vlastnostem umožňujícím výrobu elektrod o velkém povrchu jsou často používány pro preparativní elektrolýzu.

1.3 Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) jsou semipřírodní cyklické oligosacharidy. Tři základní cyklodextriny jsou: α -CD, β -CD a γ -CD, které jsou tvořeny šesti, sedmi, respektive osmi molekulami cukru [33]. Cukerné jednotky jsou tvořeny α -D-glukopyranosou a jsou spojené 1 \rightarrow 4 glykosidickou vazbou. Cyklodextriny jsou krystalické, homogenní a nehygroskopické sloučeniny. Díky jejich schopnosti tvořit komplexy s nejrůznějšími látkami mohou být důležité vlastnosti těchto látek významně modifikovány. Toto „molekulární zapouzdření“ je využíváno v průmyslu i v analytické praxi.

Jako důsledek 1 \rightarrow 4 konformace glukopyranosových jednotek jsou všechny sekundární hydroxylové skupiny orientovány na jedné ze dvou hran kruhu, zatímco primární na druhé [33]. Takto uspořádaná makromolekula má tvar seříznutého kužele. Struktura β -cyklodextrinu je zobrazena na obr. 1.3. Rozměr dutiny je větší na té straně, kde se nacházejí sekundární hydroxylové skupiny.



Obr. 1.3 Struktura β -cyklodextrinu. Obrázek dostupný online z: <http://www.trc-canada.com/Structures/C987830.png>.

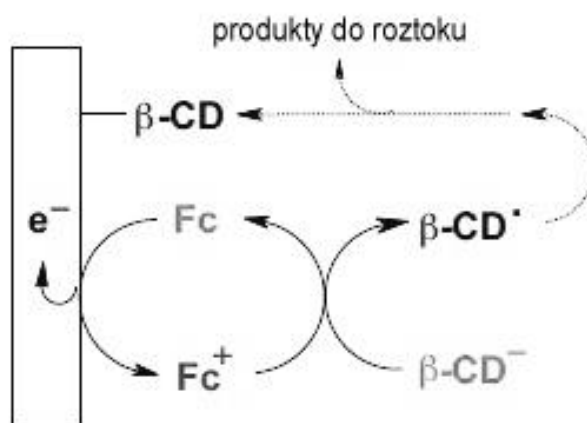
Nevazebné elektronové páry atomů kyslíku účastnících se glykosidické vazby směřují dovnitř dutiny a tím zvyšují elektronovou hustotu – dutina tím získává určité vlastnosti Lewisovské báze. Tvorba vodíkových můstků mezi C_2 -OH a C_3 -OH skupinami sousedících glukopyranosových jednotek ovlivňuje rozpustnost a rigiditu cyklodextrinů. Například β -CD, ve kterých se tvoří kompletní sekundární pás vodíkových vazeb, jsou spíše rigidní struktury, málo rozpustné ve vodě. Naopak γ -CD jsou více flexibilní a více rozpustné [33].

1.3.1 Cyklodextriny jako elektrodové modifikátory

Cyklodextriny je možné imobilizovat na elektrodě za použití adsorpce a jejich schopnosti tvořit samsopřádající se monovrstvy, přípravou polymerních filmů či jejich inkorporací do membrán či pastových elektrod [34]. Modifikované cyklodextrinové komplexy jsou schopny mediace elektronového přenosu. Díky svému tvaru mohou cyklodextriny tvořit *host-guest* komplexy se širokým spektrem organických i anorganických iontů a molekul o vhodné velikosti (0,5–0,8 nm) ve vodném, nevodném i smíšeném prostředí. Komplexace vede k ukotvení malých částic do dutiny bez tvorby kovalentní chemické vazby a bez změny jejich struktury.

Převládajícími interakcemi při tomto ději jsou van der Waalsovy síly, vodíkové můstky a hydrofobní interakce.

Příkladem modifikace elektrody ze skelného uhlíku a HOPG kovalentně navázanými cyklodextriny je studie Hernándezové-Muñozové et al. [35]. Tato modifikace proběhla s využitím ferrocenu jako katalyzátoru, schématické znázornění je zobrazeno na obr 1.4. Metoda je založena na generaci cyklodextrinových radikálů. Tyto radikály vznikají mechanismem, který zahrnuje vznik ferroceniového kationtu, oxidujícího cyklodextrinový monoanion, což dává vzniknout volnému radikálu, následně se kovalentně vázají na povrch elektrody.



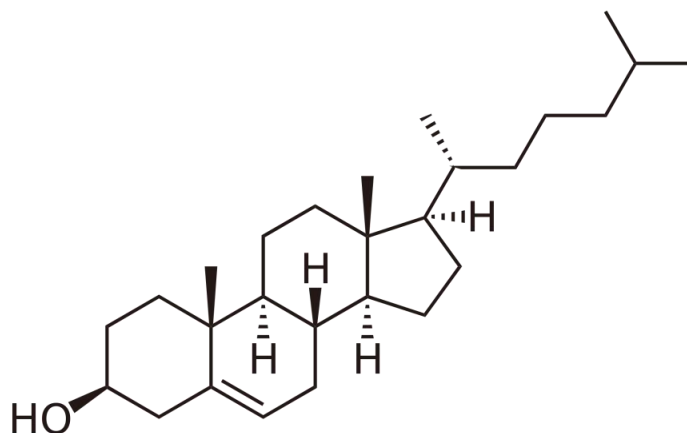
Obr. 1.4 Schéma modifikace uhlíkové elektrody cyklodextriny. Převzato z [35].

1.3.2 Cyklodextriny a žlučové kyseliny

Egawa et al. [36] využili ke studiu vlastností komplexů cyklodextrinů a žlučových kyselin zlatou elektrodu modifikovanou lipoylamino- β -CD a lipoylamino- γ -CD. Tyto cyklodextriny byly adsorbovány na povrch elektrody za využití vazby síra-zlato. Pro popis takto modifikované elektrody a její interakce se žlučovými kyselinami byl využit systém $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Výsledné elektrody vykazovaly pro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ kvazireverzibilní voltamogramy ve vodném prostředí a ΔE_p se v tomto případě rovnala 85 mV při rychlosti polarizace 20 mV s^{-1} . Po přidání žlučových kyselin se v závislosti na koncentraci ΔE_p zvýšil na 200–300 mV. To bylo způsobeno změnami elektrického

potenciálu díky akumulaci negativního náboje na povrchu elektrody a zvýšením hydrofobicity elektrodového povrchu jako důsledku navázání hydrofobních žlučových kyselin do cyklodextrinových membrán.

1.4 Žlučové kyseliny



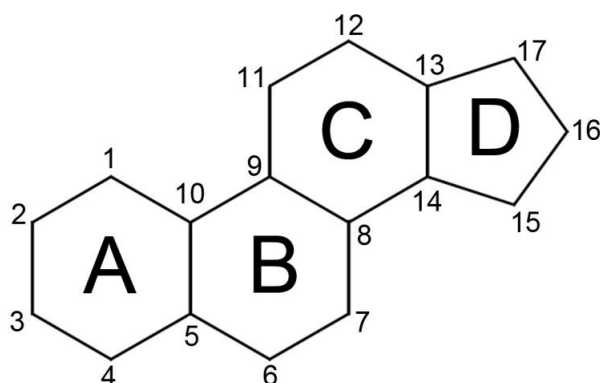
Obr. 1.5 Struktura cholesterolu.

Vznik žlučových kyselin lze u savců považovat za nejdůležitější metabolickou cestu vylučování cholesterolu, který je zobrazen na obr. 1.5 [37]. Tyto látky se z fyziologického hlediska podílejí na vstřebávání tuků. Jedná se o amfipatické molekuly [39]. Hlavní primární žlučové kyseliny jsou u lidí cholová a chenodeoxycholová kyselina. Ty vznikají z cholesterolu v játrech a poté jsou sekretovány se žlučí do tenkého střeva. Žlučové kyseliny byly ze žluči poprvé izolovány počátkem 19. století, kdy ještě nebyla známa jejich struktura. Z toho důvodu lze hledat původ názvu ve jméno organismu, z něhož byla kyselina izolována, případně v poznacích získaných elementární analýzou. Bude-li jako příklad uvedena ursodeoxycholová kyselina, potom zjistíme, že byla poprvé izolována ze žluči medvěda a obsahuje o jeden atom kyslíku méně, než cholová kyselina (*ursus* – lat. medvěd, *chole* – řec. žluč).

1.4.1 Struktura žlučových kyselin

Na základě počtu atomů uhlíku v molekule lze rozlišovat dva základní typy žlučových kyselin, a to C_{24} a C_{27} [39]. U savců jsou dominantní C_{24} žlučové kyseliny s pětiuhlíkatým řetězcem na C_{17} , jehož součástí je typicky také jediná karboxylová skupina, kterou lze v těchto sloučeninách nalézt. Hydroxylová a/nebo ketoskupina se nachází na C_3 jako pozůstatek cholesterolu a dále mohou být stejné skupiny přítomny na C_7 a C_{12} . Hydroxylace na jiných pozicích se mohou v přírodě vyskytnout, avšak nejsou běžné [40]. Struktury vybraných žlučových kyselin lze nalézt v tab. 1.1.

Tab. 1.1 Chemická struktura vybraných žlučových kyselin.



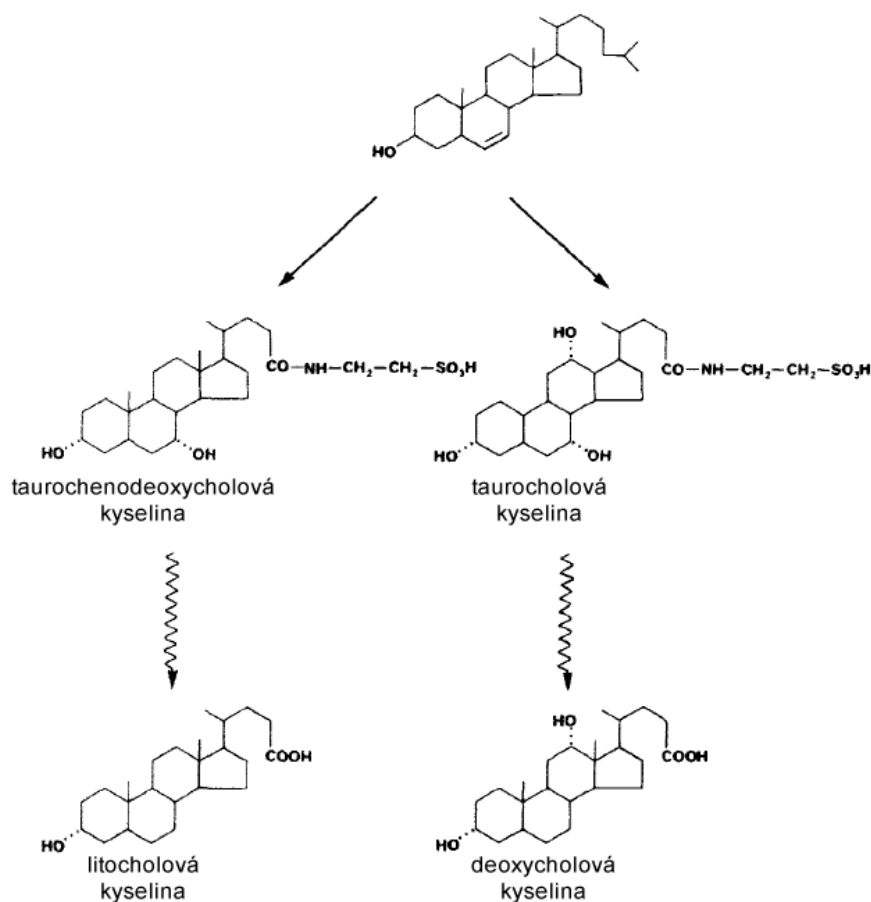
kyselina	kruh A	kruh B	kruh C	kruh D
cholová	3 α OH	7 α OH	12 α OH	17 $C(CH_3)CH_2CH_2COOH$
chenodeoxycholová	3 α OH	7 α OH		17 $C(CH_3)CH_2CH_2COOH$
dehydrocholová	3 O	7 O	12 O	17 $C(CH_3)CH_2CH_2COOH$
deoxycholová	3 α OH		12 α OH	17 $C(CH_3)CH_2CH_2COOH$
litocholová	3 α OH			17 $C(CH_3)CH_2CH_2COOH$
ursodeoxycholová	3 α OH	7 β OH		17 $C(CH_3)CH_2CH_2COOH$
tauroursodeoxycholová	3 α OH	7 β OH		17 $C(CH_3)CH_2CH_2CONHCH_2CH_2SO_3^-$

1.4.2 Biochemie žlučových kyselin

Konverze cholesterolu na žlučové kyseliny je příkladem vysoké kapacity jater přeměňovat lipofilní látky na ve vodě rozpustné a vylučitelné produkty. Jedná se o reakce velmi podobné standardnímu metabolismu a zbavování se lipidů a xenobiotik: hydroxylace, oxidace a konjugace. Rozdíl je však v tom, že reakce vzniku žlučových kyselin jsou vysoce specifické a minimálně jedna z hydroxylací je metabolicky kontrolována [39].

Reakce běžně probíhající při metabolismu cholesterolu jsou: nasycení dvojně vazby mezi C₅ a C₆, epimerizace 3β-hydroxylové skupiny a případné zavedení hydroxylových skupin na pozice 7α a 12α [37]. Dále pak oxidace osmiuhlíkatého postranního řetězce vázaného na C₁₇ na C₂₄ karboxylovou kyselinu. Po biosyntéze z cholesterolu jsou C₂₄ žlučové kyseliny aktivovány koenzymem A a konjugovány s taurinem či glycinem [39]. Konjugace probíhá vznikem amidové vazby mezi karboxylovou skupinou žlučové kyseliny a amino skupinou taurinu (glycinu). Dalšími možnostmi konjugace jsou sulfatace, esterová glukuronidace, etherová konjugace na jádře a C₇ N-acetylglukosaminace.

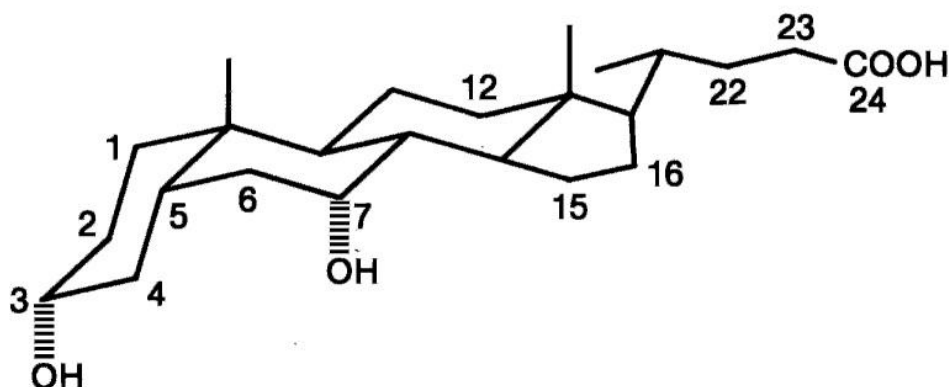
Poté, co jsou takto vzniklé primární žlučové kyseliny, především tedy cholová a chenodeoxycholová, sekretovány do střeva, mohou být přeměněny mikroorganismy. Tyto modifikace zahrnují například oxidaci, epimerizaci či ztrátu hydroxylových skupin na steroidním jádře. Takto vznikají sekundární žlučové kyseliny, jako například lithocholová či deoxycholová kyselina (vznik konjugovaných primárních a nekonjugovaných sekundárních žlučových kyselin je naznačen na obr. 1.6). Většina žlučových kyselin je ve střevě opět absorbována a s portální krví vrácena do jater. Pouze přibližně 0,5 g cholesterolu, což zhruba odpovídá jeho denní produkci v lidském organismu, je vyloučeno ve stolici. Žlučové kyseliny, vracející se enterohepatálním cyklem zpět do jater, mohou být před opětovným vyloučením do žluči dále metabolizovány.



Obr. 1.6 Přeměna cholesterolu na primární žlučové kyseliny taurochenodeoxycholovou a taurocholovou a poté na sekundární žlučové kyseliny lithocholovou a deoxycholovou. Převzato z [37].

1.4.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti žlučových kyselin

Běžné žlučové kyseliny jsou amfifilní molekuly obsahující dvě rozdílné uhlovodíkové části, hydrofobnější β část postrádající hydrofilní substituenty a hydrofilnější α část molekuly, která obsahuje jednu, dvě nebo tři hydroxylové (méně často pak glukuronátové či sulfátové) funkční skupiny [41]. Konformační vzorec chenodeoxycholové kyseliny je znázorněn na obr. 1.7.



Obr. 1.7 Konformační vzorec chenodeoxycholové kyseliny. Horní část molekuly je hydrofobnější β část a spodní pak α část, kam směřují hydroxylové skupiny a je hydrofilnější. Převzato z [39].

1.4.3.1 Hydrofilita a hydrofobicita

Většinu fyziologických, patofyziologických a metabolických vlastností žlučových kyselin a solí můžeme přisoudit jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem jako například povrchové aktivitě a chování podobnému detergentům [38]. Různé, v předchozích odstavcích zmiňované modifikace (hydroxalace, oxidace, konjugace) mají velký vliv na polaritu jak steroidního jádra, tak postranního řetězce. Celkový vliv hydrofilních funkčních skupin oproti vlivu uhlovodíkového skeletu exponovaného vodě se nazývá hydrofilně-hydrofobní rovnováha. Pro kvantitativní stanovení hydrofilně-hydrofobních vlastností solí Armstrong et al. [41] použili HPLC s reverzními fázemi a ukázali, že RP-HPLC mobilita, která koreluje s hydrofilitou, byla značně ovlivněna jak pozicí, tak orientací hydroxylových skupin. Mobilita klesala v pořadí ursodeoxycholát > cholát > chenodeoxycholát > deoxycholát. Mobilitu taktéž ovlivňovala konjugace. Ukázalo se, že byla vyšší pro konjugáty s taurinem než s glycinem, které zase vykazovaly vyšší mobilitu než volné soli.

1.4.3.2 Rozpustnost a kritická micelární koncentrace

Žlučové kyseliny konjugované s taurinem jsou *in vitro* ve vodě rozpustné při silně kyselém pH, s glycinem konjugované jsou špatně rozpustné v mírně kyselých roztocích a mnohé nekonjugované žlučové kyseliny jsou nerozpustné při neutrálním pH [42].

Rozpustnost jak s glycinem konjugovaných, tak nekonjugovaných žlučových kyselin roste se zvyšujícím se pH, dokud nedosáhne kritické micelární koncentrace, kdy se jejich rozpustnost stane prakticky neomezenou.

In vivo se žlučové kyseliny mohou vyskytovat jako: nerozpuštěná protonovaná kyselina; rozpuštěná protonovaná kyselina a/nebo její aniont; micela; součást složitější micely a nebo nerozpustná vápenatá sůl [42]. Srážení žlučových kyselin ve výše uvedených nerozpustných formách lze docílit změnou pH a nebo aktivity Ca^{2+} iontů.

Snaha hydrofobní části molekuly minimalizovat kontakt s vodou vede k formaci micel, což se děje při dosažení koncentrace známé jako kritická micelární koncentrace (CMC). Důležitá vlastnost žlučových kyselin je, že tvoří smíšené micely s jinak ve vodě nerozpustnými sloučeninami (například lecitinem, mastnými kyselinami nebo cholesterolem), a tím zvyšují jejich rozpustnost [43]. Micelizace není hnána pouze hydrofobním efektem, ale také vznikem vodíkových vazeb mezi hydroxylovými skupinami [44]. Specifická povaha vodíkových vazeb omezuje možné orientace jednotlivých molekul a zvyšuje „pevnost“ vzniklých agregátů. Nejedná se o molekuly s malou hydrofilní „hlavou“ a dlouhým flexibilním hydrofobním „ocasem“, jak často vypadají klasické amfifilní molekuly, ale spíše o pevnou strukturu supramolekulárního charakteru s nepříliš jasně oddělenou hydrofilní a hydrofobní částí, což vede ke specifickým samoskladným vlastnostem.

Měření kritické micelární koncentrace žlučových kyselin naznačilo, že CMC je ovlivněna jak postranním řetězcem, tak strukturou steroidního jádra [45]. Při měření hodnot CMC pro více než 50 žlučových solí se její hodnoty pohybovaly mezi 1 a více než 250 mmol l^{-1} [46]. Kritická micelární koncentrace se zvyšuje s rostoucím počtem hydroxylových či ketoskupin a při stejném počtu substituentů se zvyšuje při nahrazení hydroxylové skupiny ketoskupinou. Roli hraje také orientace hydroxylových skupin, při změně orientace z α na β dojde opět ke zvýšení CMC. Studium prostorových modelů přineslo hypotézu, že čím větší je spojitá hydrofobní plocha molekuly, tím nižší je CMC. Kritická micelární koncentrace se také exponenciálně zvyšuje se zkracováním postranního řetězce. Konjugace s glycinem a taurinem způsobuje jen malou změnu CMC [46].

1.5 Analytická chemie žlučových kyselin

Elektroanalytické metody často nejsou první volbou pro stanovení žlučových kyselin. V následujících odstavcích jsou shrnuty běžnější metody pro stanovení těchto látek. Nejcitlivější jsou metody využívající hmotnostní detekce, avšak vysoká cena těchto analýz a nároky na odbornou kvalifikaci obsluhujícího personálu limitují jejich běžné využití [47].

Z metod využívajících hmotnostní detekci nacházejí při analýze žlučových kyselin největší uplatnění metody GC-MS a kapilární LC-MS [48]. Plynová chromatografie v tandemu s hmotnostní detekcí je méně citlivá, ale nabízí rozšířené, na struktuře závislé možnosti fragmentace, což zvyšuje selektivitu analýz izomerů žlučových kyselin o stejné molekulové hmotnosti. Před analýzou za pomoci plynové chromatografie je třeba žlučové kyseliny derivatizovat, například přípravou jejich trifluoracetátových nebo trimethylsilyl etherových derivátů [49]. Limity detekce kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí, využívající ionizaci elektrosprejem a kvadrupólový hmotnostní analyzátor, jsou 10–50 pg absolutního množství v nástřiku.

Další text bude spíše zaměřen na jednodušší „*fit for purpose*“ metody pro rutinní analýzy. Tyto postupy většinou zahrnují HPLC separaci s UV či fluorescenční detekcí nebo například enzymatickou redukci NAD^+ . Také je možné použít enzymovou imunoanalýzu.

Kakiyama et al. [47] vyvinuli RP-HPLC-UV metodu pro stanovení nekonjugovaných žlučových kyselin ve stolici. Stanovovány byly ve formě 24-fenacylových esterů. Po nezbytné úpravě vzorku, izolaci a derivatizaci žlučových kyselin proběhla HPLC separace, kdy byly píky měřeny fotometricky při 254 nm. Stanovení bylo jednoduché a přesné (především pro koncentrace vyšší než $2 \times 10^{-6} \text{ mol g}^{-1}$). Metoda byla použita pro stanovení celkové koncentrace a také profilu složení žlučových kyselin ve stolici cirhotických pacientů. Byla validována pomocí metod GC-MS a LC-MS.

Gatti et al. [50] popsali metodu pro stanovení jak konjugovaných, tak nekonjugovaných žlučových kyselin v krevním séru pacientů s primární biliární cirhózou. Tato metoda je založena na HPLC separaci s fluorescenční detekcí. Volné i konjugované žlučové kyseliny byly rozděleny za užití extrakce na pevné fázi a taurinové konjugáty byly enzymaticky hydrolyzovány za užití cholyglycin hydrolázy. Frakce byly derivatizovány za užití 2-bromacetyl-6-methoxynaftalenu ve vodném roztoku obsahujícím tetrakis(decyl)amonium bromid a detekovány fluorometricky ($\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). Jak reprodukovatelnost, tak separace jednotlivých žlučových kyselin byly uspokojivé. Mez detekce byla $2 \times 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$.

Hirano et al. [51] navrhli metodu pro analýzu 3-sulfatovaných a nesulfatovaných žlučových kyselin za využití solvolýzy trifluorooctovou kyselinou. Separace na HPLC koloně proběhla za pomoci imobilizované 3α -hydroxysteroid dehydrogenázy pro analýzu séra pacientů se žloutenkou posthepatálního původu. Pro analýzu byla využita aparatura s fluorometrickou detekcí ($\lambda_{\text{exc}} = 345 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$). Fluometricky detekovaný byl redukovaný NAD^+ , produkovaný enzymatickou reakcí mezi žlučovými kyselinami a imobilizovanou 3α -hydroxysteroid dehydrogenázou. Výtěžnost metody se pohybovala okolo 97%.

Kobayashi et al. [52] izolovali protilátky z myši sleziny, které použili pro vytvoření selektivní ELISA metody pro stanovení 7-*N*-acetylglukosaminidů ursodeoxycholové kyseliny, o kterých se předpokládá, že jsou specifickými ukazateli primární biliární cirhózy.

1.6 Elektrochemické vlastnosti žlučových kyselin

Z elektroanalytického hlediska nepatří žlučové kyseliny kvůli své nízké elektrochemické reaktivitě mezi často studované látky. Přehledné shrnutí poznatků do roku 2012 přináší review Peckové a Nesměráka [53]. V literatuře jsou popsány jak příklady elektrochemické redukce, tak oxidace. Jelikož redukce žlučových kyselin není předmětem diplomové práce, budu se jí zabývat jen zběžně.

1.6.1 Redukce žlučových kyselin

Elektrochemickou redukci umožňuje přítomnost karboxylové skupiny na C₂₄, případně C₂₇. Počet studií, které se redukcí zabývaly, je velice omezený. Na klasické kapající rtuťové elektrodě stanovoval žlučové kyseliny v léčivých přípravcích Ferri et al. [54]. Výsledky byly porovnatelné s těmi získanými enzymatickými-spektrofotometrickými metodami, zjištěné lineární rozsahy se pohybovaly pro diferenční pulzní polarografii mezi 2×10^{-6} až 1×10^{-4} mol l⁻¹. Dále byla redukce žlučových kyselin předmětem zájmu několika bakalářských prací na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze, konkrétně redukce chenodeoxycholové kyseliny v práci Patákové [55], deoxycholové a ursodeoxycholové kyseliny v práci Rákosníkové [56] a tauroursodeoxycholové kyseliny v práci Pišnové [57]. Všechny autorky využívaly rovněž rtuťové elektrody.

1.6.2 Oxidace žlučových kyselin

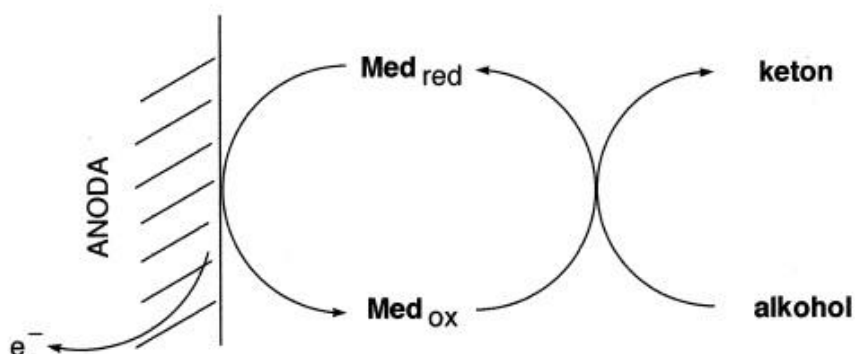
Od roku 2012, kdy vyšlo review Peckové a Nesměráka [53], nevznikly, pokud je mi známo, žádné nové články věnující se oxidaci žlučových kyselin. Jeden článek z roku 2013 se věnuje vývoji elektrochemického biosensoru cholesterolu [58]. Na následujících řádcích budou shrnuty dosavadní poznatky o možnostech elektrochemické oxidace žlučových kyselin a cholesterolu s důrazem na oxidaci na borem dopované diamantové elektrodě.

Dosáhnout přímé elektrochemické oxidace žlučových kyselin je poměrně obtížné a zpravidla je to možné pouze v nevodném prostředí, v prostředí s vysokým obsahem organické fáze, a nebo za pomoci mediátorového iontu. Obecně jsou podmínky pro přímou oxidaci cholesterolu a příbuzných látek následující: jako rozpouštědlo je použít acetonitril, jako základní elektrolyt chloristan lithný a elektrody na bázi uhlíku (GCE a BDDE) jako vhodné pracovní elektrody [59–64]. Dalším společným jmenovatelem analytického využití elektrochemické oxidace těchto látek je předchozí separace pomocí HPLC.

Ve mé bakalářské práci byla zkoumána oxidace žlučových kyselin na platinové elektrodě a elektrodě ze skelného uhlíku [1]. Bylo zjištěno, že platina není vhodným

materiálem pro oxidaci žlučových kyselin v prostředí acetonitrilu, protože získané voltamogramy nebylo možné vyhodnotit. Elektroda ze skelného uhlíku se ukázala jako vhodnější, z dat na ní naměřených bylo možné určit půlvlnové potenciály jednotlivých žlučových kyselin. Potenciály byly však velice podobné, dokonce i ve třech případech stejné, a proto byla identifikace jednotlivých kyselin ve směsi nemožná. Stanovení žlučových kyselin na GCE bylo možné za předpokladu kvalitního čištění povrchu elektrody od oxidačních produktů mezi jednotlivými měřeními.

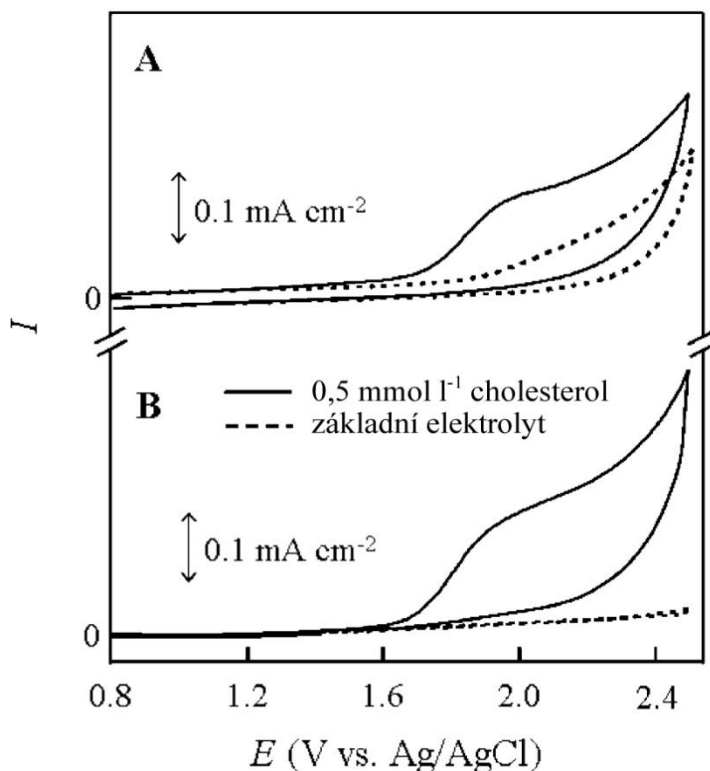
Medici et al. [65] vyhodnotili regiosektivitu nepřímé elektrochemické oxidace cholové kyseliny na různých anodách v zásaditém vodném prostředí za použití chloristanu sodného jako základního elektrolytu. Pro oxidaci použili jako mediátor elektronového přenosu chloridový aniont a následující elektrodové materiály: PbO_2 anodu, na níž je možné cholovou kyselinu kvantitativně přeměnit na dehydrocholovou kyselinu, platinovou elektrodu, na níž byla produktem 7-ketocholová kyselina a GCE, která poskytovala v závislosti na podmínkách dehydrocholovou kyselinu v kvantitativním výtěžku a nebo její směs s dalšími oxidačními produkty. Schéma mediovaného přenosu elektronu je znázorněno na obr. 1.8. Bylo zjištěno, že za těchto podmínek se jednotlivé hydroxylové skupiny oxidují v následujícím pořadí: $\text{C7} > \text{C12} > \text{C3}$. Tato skupina dále popsala přímo metodu elektrochemické syntézy dehydrocholové kyseliny za použití cholové kyseliny jako výchozí látky [66]. Jako vhodné pro tuto nepřímou elektrochemickou oxidaci se ukázaly elektrody s vysokým přepětím kyslíku (PbO_2 a grafitová). Použitá proudová hustota pro syntézu byla 125 A m^{-2} .



Obr. 1.8 Schematické znázornění mediované elektrochemické oxidace. Převzato z [65].

Hojo et al. oxidovali cholesterol ve směsi acetonitrilu a propan-2-olu (9:1, v/v) na GCE [59]. Jako základní elektrolyt byl použit $5 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ chloristan lithný. Produkty oxidace byly podrobeny IČ, NMR a MALDI-TOF-MS analýze a produkt byl identifikován jako cholesta-4,6-dien-3-on. Jako mechanismus této elektrochemické oxidace navrhli čtyřelektronový, čtyřprotonový proces. Limit detekce cholesterolu byl v tomto případě $3,6 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$. Stejná skupina se zabývala stanovením cholestanolu, kdy dosáhli limitu detekce $2,3 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ [60].

Kotani et al. [62] stanovili cholesterol za pomoci HPLC separace v kombinaci s elektrochemickou detekcí za použití nevodné mobilní fáze. Jako pracovní elektrodu zvolili BDDE. Nejprve byla porovnána možnost oxidace cholesterolu na GCE a BDDE, výsledné voltamogramy jsou zobrazeny na obr. 1.9.



Obr. 1.9 Cyklické voltamogramy $5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ cholesterolu v prostředí acetonitrilu. Základní elektrolyt: $5 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1} \text{ LiClO}_4$. Elektroodové materiály: (A) GCE a (B) BDDE. Rychlost polarizace byla 20 mV s^{-1} , potenciál měřen proti Ag/AgCl referenční elektrodě. Převzato z [62].

Cholesterol se na obou elektrodách oxiduje při vysokých kladných potenciálech (+2,02 V pro GCE a +2,05 V pro BDD elektrodu proti Ag/AgCl) a tento děj je řízen

difúzí. Proudová hustota anodického píku byla vyšší a poměr signál-pozadí byl lepší pro oxidaci na BDD elektrodě. Nízký nabíjecí proud na BDD elektrodě autoři přisuzují kompaktnímu, neporéznímu povrchu elektrody stejně jako dominujícím H-terminacím BDD. Naopak relativně vysoký nabíjecí proud GCE má podle autorů původ ve vnikání molekul acetonitrilu mezi tenké vrstvy krystalizovaného grafitu. Potenciál pro amperometrickou detekci cholesterolu metodou HPLC-ED byl stanoven jako +2,2 V proti Ag/AgCl.

Borem dopovaná diamantová elektroda byla, jakožto vhodnější elektrodový materiál, použita pro stanovení cholesterolu v různorodých vzorcích masa, přičemž se ukázalo, že se jedná o přesnou metodu s dobrou výtěžností i reprodukovatelností, která umožňuje analýzu i ve složité matrici. Limit detekce byl $8 \times 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$. Signálová odezva byla stabilní po dobu více než čtyř měsíců při osmi analýzách denně.

2 Experimentální část

2.1 Studované látky

Byla studována elektrochemická oxidace sedmi vybraných žlučových kyselin: cholové, chenodeoxycholové, dehydrocholové, lithocholové, deoxycholové, ursodeoxycholové, tauroursodeoxycholové a cholesterolu. Látky byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Deklarovaná minimální čistota byla 99,98%.

2.2 Použité chemikálie

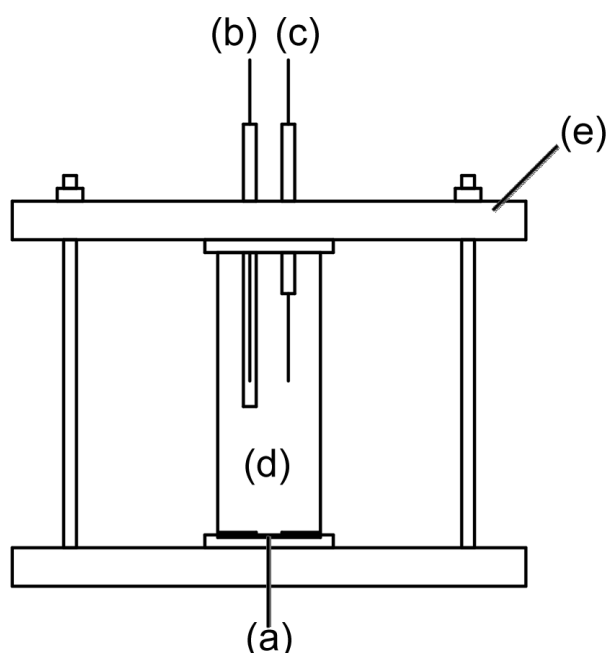
Ostatní použité chemikálie byly (pokud není udáno jinak) analytické čistoty: β -cyklodextrin (Merck), aceton (Sigma-Aldrich), acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich), alumina (Elektrochemické detektory), bezvodý chloristan sodný pro HPLC (Fluka), diethylether (Lachema), dimethylsulfoxid pro HPLC (Macron), dusičnan stříbrný Ph. Eur. 3 (Fluka), ethylacetát (Lachema), ferrocen (Sigma-Aldrich), hexakynoželeznatan draselný (Lachema), isooktan pro HPLC (Sigma-Aldrich), kyselina fosfomolybdenová 20% (Sigma-Aldrich), kyselina chloristá 70% (Sigma-Aldrich), kyselina sírová 96% (Lach-Ner), methanol pro HPLC (Sigma-Aldrich), *n*-butanol (Penta), octová kyselina p.a. (Lachner) a tetrabutylamonium hexafluorborát (Fluka).

2.3 Metody měření a zpracování dat

Všechna voltametrická měření proběhla na přístroji EZStat Pro od firmy NuVant Systems (Crown Point, IN, USA) za pomoci výrobcem dodaného softwaru. Ke zpracování naměřených dat byly použity následující počítačové programy: OriginPro 2015 od firmy OriginLab Corporation (Northampton, MA, USA), MS Excel od firmy Microsoft Corporation (USA) a QCAD 3.9.5 od firmy RibbonSoft (Sarnen, Švýcarsko).

2.3.1 Voltametrie na elektrodě z HOPG

Jako pracovní elektroda byla použita elektroda z HOPG o rozměrech $10 \times 10 \times 6$ mm, kvality ZYB od firmy SPI Suppliers/Structure Probe (West Chester, PA, USA). Vlastní vrstva HOPG, sloužící jako pracovní elektroda, byla před každým záznamem voltametrické křivky oddělena z původní destičky oboustrannou adhezní páskou, připevněna na podložku a vodivě spojena s měřicím zařízením. Měření probíhala v mikroelektrochemické nádobce, schematicky zobrazené na obr. 2.1. Objem měřených roztoků byl 1,00 ml. Dno cely bylo tvořeno pracovní elektrodou, na které bylo uloženo těsnění Viton (fluoropolymer) s centrálním otvorem o průměru 4 mm. Mezi těsnění a pracovní elektrodu byl vložen vodivý kontakt tvořený měděným plíškem. Cela byla sevřena mosazným svěrákem sloužícím zároveň jako kontakt pracovní elektrody. Jako základní elektrolyt byl pro měření použit $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný v acetonitrilu. Měření proběhlo v potenciálovém rozsahu $-1,0$ až $+2,8 \text{ V}$. Rychlost polarizace byla 100 mV s^{-1} . Jako referenční elektroda byla využita Pleskovova nevodná referenční elektroda a jako pomocná elektroda sloužil platinový drátek. Změřen byl roztok lithocholové kyseliny o koncentraci $5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.



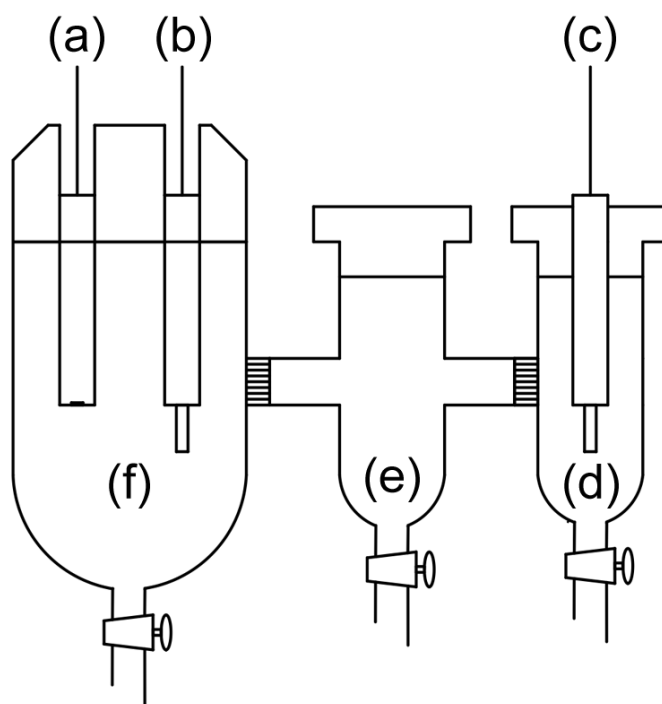
Obr. 2.1 Mikroelektrochemická cela použitá pro měření s HOPG, kde (a) je pracovní elektroda překrytá těsněním Viton, (b) Pleskovova nevodná referenční elektroda, (c) platinový drátek jako pomocná elektroda, (d) pracovní prostor a (e) mosazný svěrák.

2.3.2 Voltametrie na GCE modifikované β -cyklodextrinem

Na elektrodě ze skelného uhlíku ($d = 3$ mm) od firmy Radiometer Analytical SAS (Villeurbanne, Francie) nejprve proběhlo měření za použití její nezmodifikované podoby. Měření probíhalo ve voltametrické cele schematicky zobrazené na obr. 2.2. Objem měřených roztoků byl 20 ml. Jako základní elektrolyt byl použit $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný v acetonitrilu. Měření probíhalo v potenciálovém rozmezí $+0,2$ až $+2,4$ V, rychlost polarizace elektrody byla 50 mV s^{-1} . Jako referenční elektroda byla použita Pleskovova nevodná referenční elektroda a jako pomocná elektroda platinový plíšek. Byly zaznamenány LS voltamogramy roztoku chenodeoxycholové kyseliny.

Postup modifikace byl inspirovaný článkem Hernándezové-Muñozové et al. [35]. Byl připraven modifikační roztok o následujícím složení: jako rozpouštědlo byl použit dimethylsulfoxid, jako základní elektrolyt $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ tetrabutylamonium hexafluorborát, jako mediátor elektronového přenosu $0,001 \text{ mol l}^{-1}$ ferrocen a cyklodextriny byly v roztoku zastoupeny β -cyklodextrinem o koncentraci $0,01 \text{ mol l}^{-1}$. Poté byla elektroda cyklována v rozsahu potenciálu od $-0,5$ do $+0,8$ V rychlostí 50 mV s^{-1} . Jako referenční elektroda byla použita Pleskovova nevodná referenční elektroda a jako pomocná elektroda platinový plíšek.

Na zmodifikované elektrodě byly za stejných podmínek jako před modifikací naměřeny voltamogramy pro chenodeoxycholovou kyselinu.



Obr. 2.2 Elektrochemická cela použitá pro měření s GCE a BDDE, kde (a) je pracovní elektroda (BDDE, GCE), (b) platinový plíšek jako pomocná elektroda, (c) stříbrný plíšek jako součást referenční elektrody, (d) prostor referenční elektrody obsahující $0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3$ a $1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$ v acetonitrilu, (e) meziprostor obsahující $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$ v acetonitrilu a (f) pracovní prostor.

2.3.3 Voltametrie na BDDE

Jako pracovní elektroda byla použita komerčně dostupná borem dopovaná diamantová elektroda ($d = 3 \text{ mm}$) v teflonovém těle od firmy Windsor Scientific Ltd. (Slough, Velká Británie) a elektroda D8x2 v těle z polyetheretherketonu ($d = 6 \text{ mm}$) od firmy OrigaLys (Rillieux la Pape, Francie). Měření probíhala ve voltametrické cele zobrazené na obr. 2.2 a objem měřených roztoků byl 20 ml. Jako referenční elektroda byla použita Pleskovova nevodná referenční elektroda. Jako pomocná elektroda byl použit platinový plíšek.

2.3.3.1 Vliv methanolu a vody na šířku potenciálového okna

Měření probíhalo na elektrodě Windsor. Jako základní elektrolyt byl použit chloristan sodný o koncentraci $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ rozpuštěný v acetonitrilu. Měřený potenciálový rozsah byl $-1,0$ až $2,85 \text{ V}$. Rychlost polarizace pracovní elektrody byla 100 mV s^{-1} . Byly připraveny roztoky s různým zastoupením methanolu a vody a byly zaznamenány jejich voltamogramy.

2.3.3.2 Vliv aktivace a předpřípravy BDDE na oxidaci žlučových kyselin

Byla studována jak katodická, tak anodická aktivace mezi záznamy jednotlivých křivek a celková předpříprava elektrody před sérií měření. Měření probíhalo na elektrodě D8x2.

Katodická předpříprava elektrody probíhala následujícím způsobem: nejprve byl na elektrodu po dobu 10 minut vkládán katodický proud -70 mA ve vodném roztoku kyseliny sírové o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$. Poté, už v nevodném prostředí obsahujícím chloristan sodný o koncentraci $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ v acetonitrilu, proběhla měření lithocholové kyseliny v potenciálovém rozmezí $+0,2$ až $+2,4$ V rychlostí polarizace 50 mV s^{-1} . Před každým jednotlivým záznamem voltametrické křivky proběhla katodická aktivace elektrody při potenciálu $-2,0$ V po dobu 1, 5, 10, 30 a 60 s.

Anodická předpříprava elektrody probíhala následovně: na elektrodu byl po dobu 10 minut vkládán potenciál $+2,8$ V ve vodném roztoku kyseliny sírové o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$. V nevodném prostředí poté proběhla měření lithocholové kyseliny za stejných podmínek jako po katodické předpřípravě. Rozdílná byla pouze anodická aktivace elektrody, která probíhala před každým záznamem voltametrické křivky při potenciálu $+2,8$ V po dobu 1, 5, 10, 30 a 60 s.

2.3.3.3 Oxidace žlučových kyselin ve směsném prostředí

Měření probíhalo na elektrodě Windsor. Předběžná měření proběhla v roztocích základního elektrolytu (směsi acetonitrilu a 1 mol l^{-1} roztoku kyseliny chloristé), které se lišily obsahem vody a kyseliny. Rozpuštěním v těchto roztocích základního elektrolytu byly připraveny roztoky chenodeoxycholové kyseliny, jejichž voltamogramy byly následně zaznamenány. Měření proběhla v potenciálovém rozsahu $+0,2$ až $+2,0$ V rychlostí polarizace 50 mV s^{-1} . Povrch elektrody byl mezi jednotlivými koncentracemi základního elektrolytu leštěn po dobu pěti minut na alumině, poté byl opláchnut acetonem a osušen buničinou. Byl vyhodnocen optimální poměr acetonitril:voda a vybrána vhodná koncentrace kyseliny chloristé.

Měření kalibračních přímk vybraných žlučových kyselin probíhala v základním elektrolytu obsahujícím $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyselinu chloristou a obsah vody byl $0,26 \%$ v/v. Zásobní roztoky vzorků žlučových kyselin byly připraveny odvážením zakoupeného standardu žlučové kyseliny, jeho rozpuštěním v acetonitrilu a následné sonikaci po dobu patnácti minut.

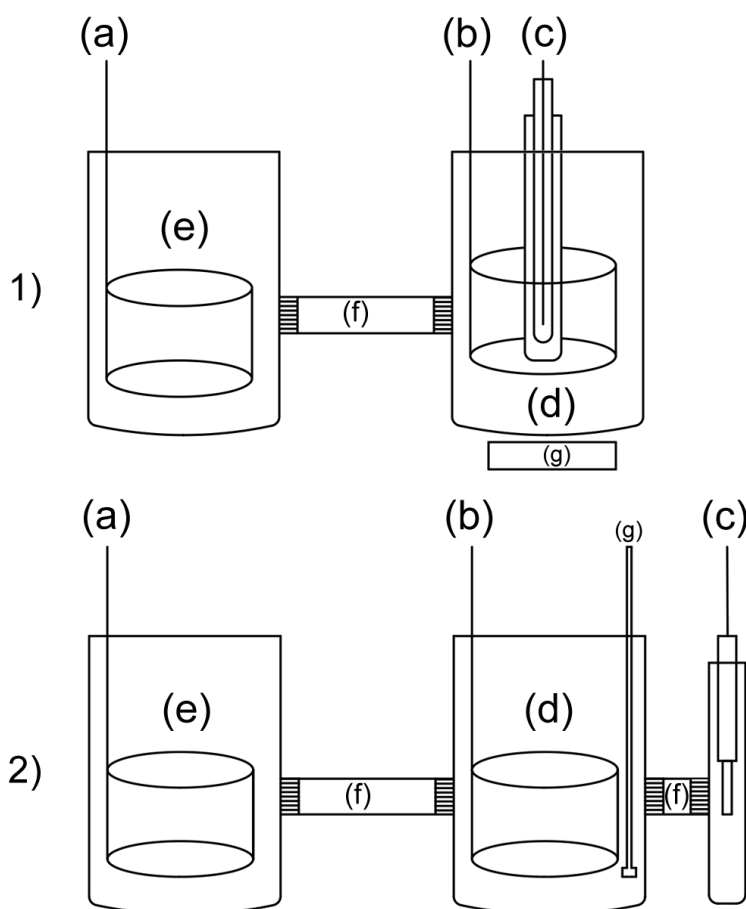
Ze zásobních roztoků byly připraveny vzorky o zvolených koncentracích. Tyto vzorky byly podrobeny voltametričkému měření v potenciálovém rozsahu +0,2 až +2,0 V. Před každým záznamem voltametričké křivky byl na elektrodu vložen potenciál +0,2 V po dobu 5 s. Rychlost polarizace byla 50 mV s^{-1} . Každé měření bylo pětkrát opakováno. Povrch elektrody byl mezi jednotlivými koncentracemi žlučových kyselin leštěn po dobu 5 minut na alumině, poté byl opláchnut acetonem a osušen buničinou.

2.3.4 Preparativní elektrolýza na platinové elektrodě

Preparativní elektrolýza probíhala na velkoplošné platinové elektrodě v nádobce zobrazené na obr. 2.3 v původní (1) a upravené (2) podobě s oddělenou referenční elektrodou. Objem elektrolyzovaných roztoků byl 40 ml. Potenciál byl kontrolován potenciostatem EG&G Princeton Applied Research 273 (Oak Ridge, TN, USA). Jako základní elektrolyt byl použit chloristan sodný o koncentraci $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ rozpuštěný v acetonitrilu. V obou případech byla použita Pleskovova nevodná referenční elektroda a platinová síťka jako pomocná elektroda.

Na velkoplošné platinové elektrodě byly v původní nádobce (obr. 2.3, 1) oxidovány následující žlučové kyseliny: litocholová, cholová, chenodeoxycholová, dehydrocholová a také cholesterol. Nejprve proběhla předběžná elektrolýza základního elektrolytu při potenciálu +2,0 V po dobu dvaceti minut. Poté byly vzorky žlučových kyselin kvantitativně převedeny do měřicí nádoby. Samotná elektrolýza proběhla po dobu jedné hodiny při potenciálu +2,0 V. Po elektrolýze byl výsledný roztok odpařen na vakuové odparce, produkt oxidace byl extrahován do chloroformu a znovu odpařen. Nakonec byl rozpuštěn v malém množství chloroformu, převeden do vialky a vysušen v sušárně při teplotě $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

V upravené nádobce (obr. 2.3, 2) byla na velkoplošné platinové elektrodě oxidována chenodeoxycholová kyselina. Podmínky elektrolýzy byly stejné jako v původní nádobce, lišily se pouze doby oxidace, ty byly 4,5 a 8,5 hodiny. Po elektrolýze byl výsledný roztok odpařen na vakuové odparce, produkt oxidace extrahován do chloroformu a znovu odpařen.



Obr. 2.3 Elektrochemické cely použité pro preparativní analýzu s platinovou elektrodou, kde (a) pomocná platinová síťková elektroda, (b) pracovní platinová síťková elektroda, (c) referenční Pleskovova nevodná elektroda oddělená meziprostorem, (d) prostor pracovní elektrody, (e) prostor pomocné elektrody, (f) meziprostor obsahující $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$ v acetonitrilu a (g) magnetické/rotační míchadlo.

2.3.5 Spektrofotometrická měření

Sledování průběhu elektrolýzy proběhlo pomocí spektrofotometrického měření na spektrofotometru Hewlett-Packard 8454 (USA) v křemenné kyvetě Hellma 108.022-QS 10 mm (Müllheim, Německo). Měření probíhala v rozmezí vlnových délek 190–1100 nm.

2.3.6 Tenkovrstvá chromatografie

Produkty získané preparativní elektrolýzou byly podrobeny TLC analýze. Pro tenkovrstvou chromatografii byly použity komerční tenké vrstvy Silufol od firmy Kavalier (Votice, ČR) se

sorbentem Silpearl. Jako mobilní fáze byla na základě literatury použita směs isooktan:diethyl ether:*n*-butanol:kyselina octová v poměru 10:2,5:1:1 v/v [67]. Pro vizualizaci byla využita kombinace postřiku 5% kyselinou fosfomolybdenovou, 10% kyselinou sírovou a zahřátí v pícce na 90 °C po dobu 10 minut. Zároveň byla také využita UV lampa Krüss (Hamburg, Německo) pracující se zářením o vlnových délkách 254 a 366 nm.

2.3.7 Infračervená spektrometrie

K charakterizaci oxidačních produktů získaných preparativní elektrolýzou byla použita infračervená spektrometrie. Analýza byla provedena za pomoci Mgr. Michala Schwarze, PhD. Spektra byla měřena na FTIR spektrometru Nicolet ve střední IČ oblasti 4000–600 cm⁻¹. K měření infračervených spekter vzorků bylo využito odrazového měření – metoda zeslabení úplného odrazu (*attenuated total reflection*) ATR-FTIR. ATR nástavec obsahuje ZnSe krystal, na který byl umístěn vzorek, přitlačen přitlačkou (pro zajištění dokonalého kontaktu vzorku s ZnSe krystalem) a následně bylo změřeno IČ spektrum.

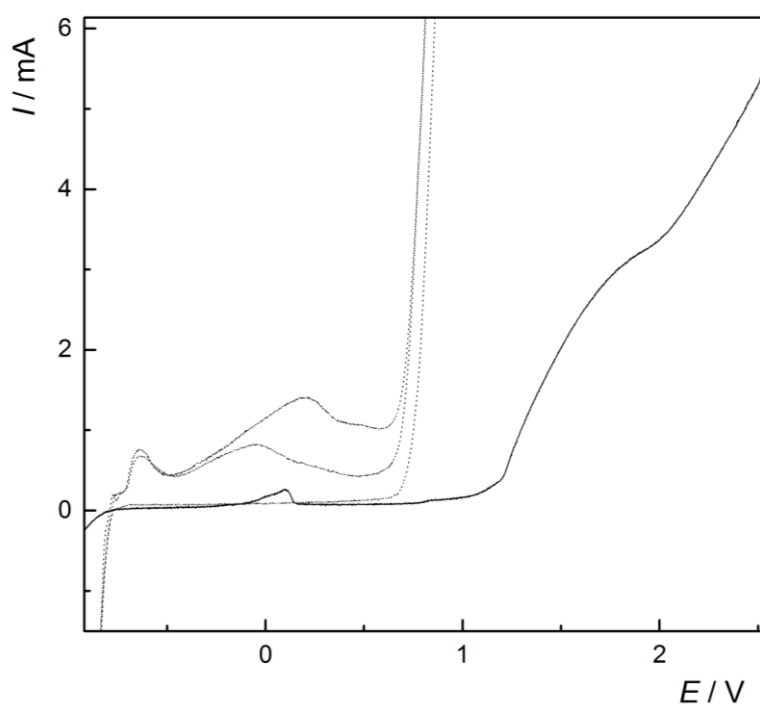
2.3.8 Nukleární magnetická rezonance

Analýza nukleární magnetickou rezonancí byla provedena na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR RNDr. Martinem Dračinským, PhD. Spektra vzorků rozpuštěných v deuterovaném dimethylsulfoxidu byla měřena na spektrometru Bruker AVANCE III pracujícím na frekvenci 500,0 MHz pro jádra ¹H a 125,7 MHz pro jádra ¹³C.

3 Výsledky a diskuze

V této kapitole jsou prezentovány výsledky studia možností oxidace vybraných žlučových kyselin na elektrodách z vysoce orientovaného pyrolytického grafitu, skelného uhlíku a borem dopovaného diamantu. Dále také výsledky preparativní oxidace vybraných žlučových kyselin a cholesterolu na platinové elektrodě.

3.1 Voltametrie na HOPG



Obr. 3.1 LS voltamogram lithocholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na elektrodě z HOPG. Koncentrace lithocholové kyseliny: $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaná křivka, tři nezávislá měření), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody $12,6 \text{ mm}^2$, potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.

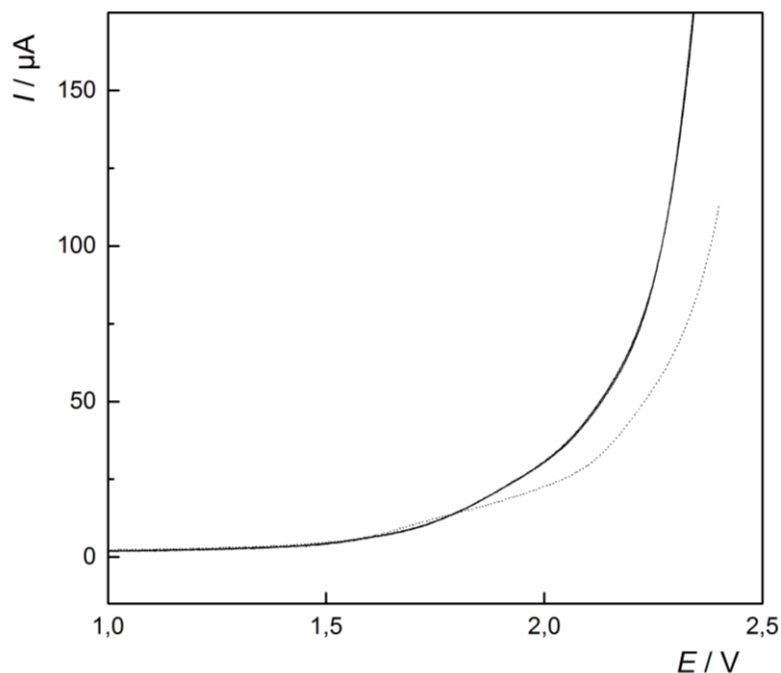
Na HOPG proběhlo měření lithocholové kyseliny v nevodném prostředí acetonitrilu. Měření byla podnícena výsledky, kterých bylo dosaženo na GCE a jsou popsány v mé bakalářské práci [1]. Výsledné voltamogramy se však vyznačovaly špatnou reprodukovatelností. Naměřené křivky jsou zobrazeny na obr. 3.1. Je zřejmé, že i voltamogramy základního elektrolytu se poměrně zásadně liší. Toto může být způsobeno nedokonalým oddělením jednotlivých vrstev HOPG, kdy při tomto úkonu mohla být bazální vrstva poškozena,

důsledkem čehož by byl elektrodový povrch špatně definovaný. Nicméně vždy platí, že voltamogram naměřený za přítomnosti litocholové kyseliny vykazuje pozdější únik elektrolytu, což naznačuje, že proběhla sorpce analytu na elektrodový povrch. Na křivce litocholové kyseliny je kolem +1,8 V zřejmý náznak vlny, což je v souladu s daty získanými na GCE [1].

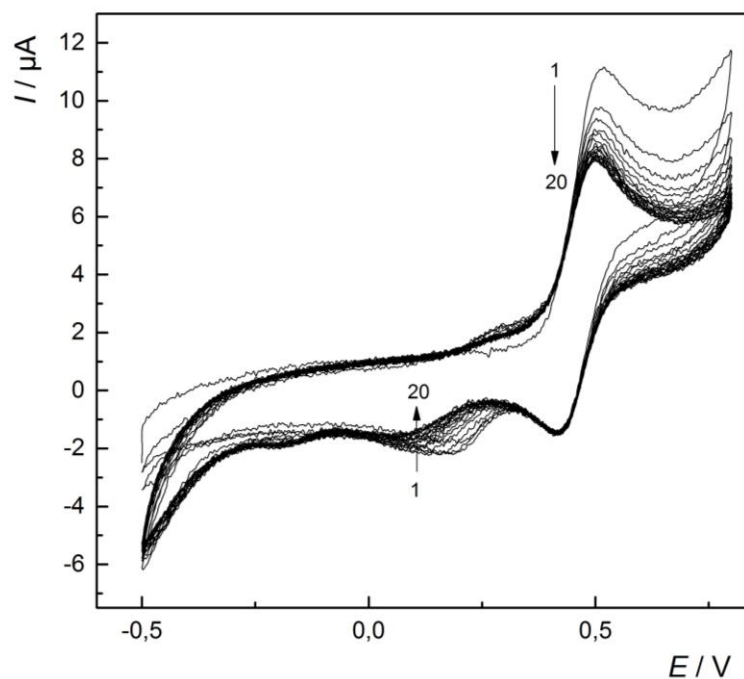
V literatuře je popsáno, že nedokonalé oddělení jednotlivých vrstev HOPG může mít za následek vysoký proud pozadí a také zvyšovat rozsah adsorpce, a proto lze neúspěch při zavedení tohoto materiálu pro elektrochemickou oxidaci žlučových kyselin velice pravděpodobně připsat nedokonalému provedení experimentu a ne samotnému materiálu, který by v budoucnu mohl přinést pozitivní výsledky [30]. Z výše popsaných důvodů, tedy za daných podmínek příliš úzkého potenciálového okna a nereprodukovatelných voltamogramů, bylo od dalších experimentů na elektrodách z vysoce orientovaného pyrolytického grafitu upuštěno.

3.2 Voltametrie na β -cyklodextrinem modifikované GCE

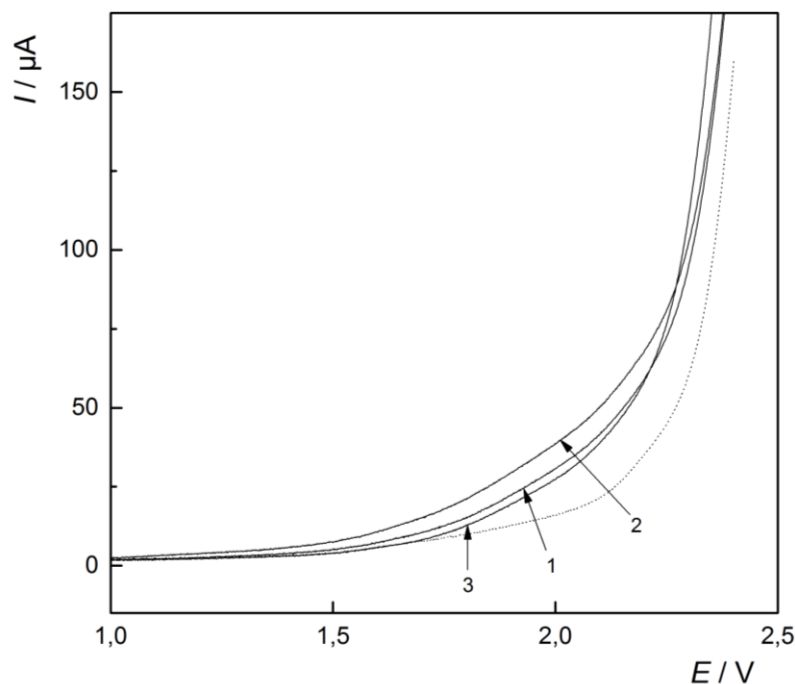
Na elektrodě ze skelného uhlíku byly nejprve naměřeny LS voltamogramy chenodeoxycholové kyseliny (obr. 3.2), poté byla provedena modifikace cyklodextriny (obr. 3.3) a následně byly znovu změřeny voltamogramy chenodeoxycholové kyseliny (obr. 3.4). Přítomnost chenodeoxycholové kyseliny na GCE se projevuje zvýšením proudu při přibližně +1,8 V a voltamogramy jsou dobře opakovatelné i bez jakékoliv aktivace mezi záznamy křivek. Modifikace nevedla k pozitivní změně průběhu voltametrických křivek a jediným pozorovatelným důsledkem byla naopak snížená reprodukovatelnost křivek (obr. 3.4). Na základě zkušeností získaných těmito předběžnými pokusy je možné do budoucna doporučit, aby byl povrch elektrody před a po modifikaci charakterizován například za pomoci mikroskopie atomových sil, která by umožnila průkaznější potvrzení modifikace, než pouhý průběh voltametrických křivek (viz obr. 3.3), který byl v souladu s literaturou [35]. Důvodem klesání proudu v následovných cyklech je pravděpodobně samo-inhibice elektrody, způsobená reakcí mezi β -CD \cdot a uhlíkovými atomy povrchu elektrody (viz schéma na obr. 1.4).



Obr. 3.2 LS voltamogram chenodeoxycholové kyseliny (tři křivky) v prostředí acetonitrilu na elektrodě ze skelného uhlíku. Koncentrace chenodeoxycholové kyseliny: $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody $7,1 \text{ mm}^2$, 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 Cyklické voltamogramy (20 cyklů) modifikačního roztoku v prostředí dimethylsulfoxidu na elektrodě ze skelného uhlíku. Koncentrace β -cyklodextrinu $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ a ferrocenu $0,001 \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ tetrabutylamonium hexafluorborát, rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody $7,1 \text{ mm}^2$, potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.

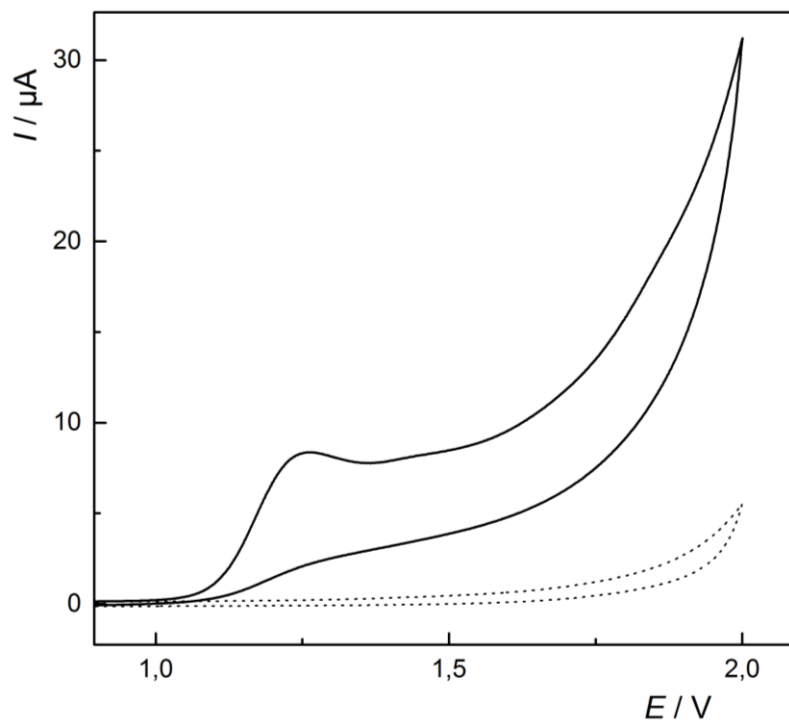


Obr. 3.4 LS voltamogram chenodeoxycholové kyseliny (tři křivky) v prostředí acetonitrilu na cyklodextriny zmodifikované elektrodě ze skelného uhlíku. Koncentrace chenodeoxycholové kyseliny: $5,0 \times 10^{-5}$ mol l^{-1} . Základní elektrolyt 0,1 mol l^{-1} chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody $7,1$ mm 2 , potenciál měřen proti Ag/0,01 mol l^{-1} AgNO $_3$ /1 mol l^{-1} NaClO $_4$.

3.3 Voltametrie na BDDE

Na borem dopované diamantové elektrodě proběhla většina měření. Byl studován vliv methanolu a vody na šíři potenciálového okna, vliv katodické a anodické předpřípravy elektrody na oxidaci lithocholové kyseliny a byl vyhodnocen nejvhodnější poměr acetonitril:voda pro analytické využití oxidace vybraných žlučových kyselin. Dále byl studován vzájemný vliv ferrocenu a žlučových kyselin na jejich voltametrickou odezvu. Ve smíšeném prostředí acetonitril:voda byly naměřeny kalibrační přímky pro všechny vybrané žlučové kyseliny s výjimkou dehydrocholové, jejíž voltamogramy nebylo možné analyticky vyhodnotit.

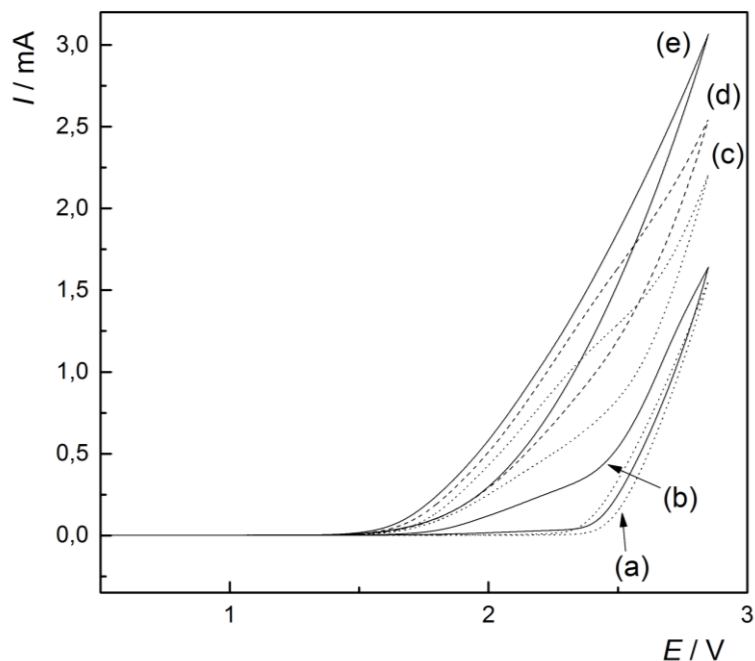
Oxidace žlučových kyselin je na BDDE ireverzibilní děj, což je ilustrováno na obr. 3.5 cyklickým voltamogramem chenodeoxycholové kyseliny. Na tomto materiálu bylo dosaženo výsledků, které nebyly doposud v literatuře popsány a mohly by přispět k vývoji elektrochemického detektoru především primárních žlučových kyselin.



Obr. 3.5 Cyklický voltamogram chenodeoxycholové kyseliny ve směsném prostředí acetonitril:voda na BDD elektrodě. Zastoupení vody: 0,26 % v/v. Koncentrace chenodeoxycholové kyseliny: 5×10^{-4} mol l^{-1} . Základní elektrolyt 0,1 mol l^{-1} kyselina chloristá (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody 7,1 mm², potenciál měřen proti Ag/0,01 mol l^{-1} AgNO₃/1 mol l^{-1} NaClO₄.

3.3.1 Vliv methanolu a vody na šíři potenciálového okna na BDDE

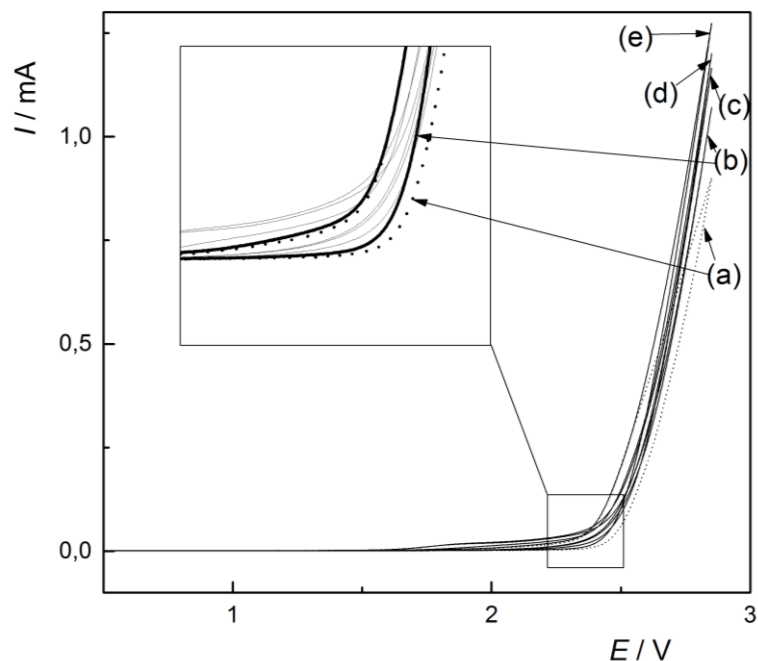
V této kapitole jsou popsány poznatky získané studiem vlivu methanolu a vody na šíři potenciálového okna. Studium vlivu těchto faktorů bylo provedeno z důvodu možného využití methanolu jako rozpouštědla žlučových kyselin a kvůli zamýšleným experimentům ve směsném prostředí acetonitril:voda.



Obr. 3.6 Cyklické voltamogramy methanolu v prostředí acetonitrilu na BDD elektrodě. Obsah methanolu: (a) 0 %, (b) 0,1 %, (c) 1%, (d) 2%, (e) 5%. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný, rychlost polarizace 100 mV s^{-1} , plocha elektrody $7,1 \text{ mm}^2$, potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.

Protože jsou žlučové kyseliny lépe rozpustné v methanolu, byl studován jeho vliv na šíři potenciálového okna (obr. 3.6). Tato měření prokázala, že methanol není možné jako rozpouštědlo žlučových kyselin pro jejich oxidaci na BDDE, protože ty se běžně oxidují při vysoce kladných potenciálech v blízkosti úniku základního elektrolytu a oxidace methanolu značně zužuje potenciálové okno [68].

Jako rozpouštědlo pro přípravu vzorků žlučových kyselin byl tedy používán výhradně acetonitril.



Obr. 3.7 Cyklické voltamogramy roztoků obsahujících vodu v prostředí acetonitrilu na BDD elektrodě. Obsah vody: (a) 0 %, (b) 0,1 %, (c) 1%, (d) 2%, (e) 5% v/v. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný, rychlost polarizace 100 mV s^{-1} , plocha elektrody $7,1 \text{ mm}^2$, potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.

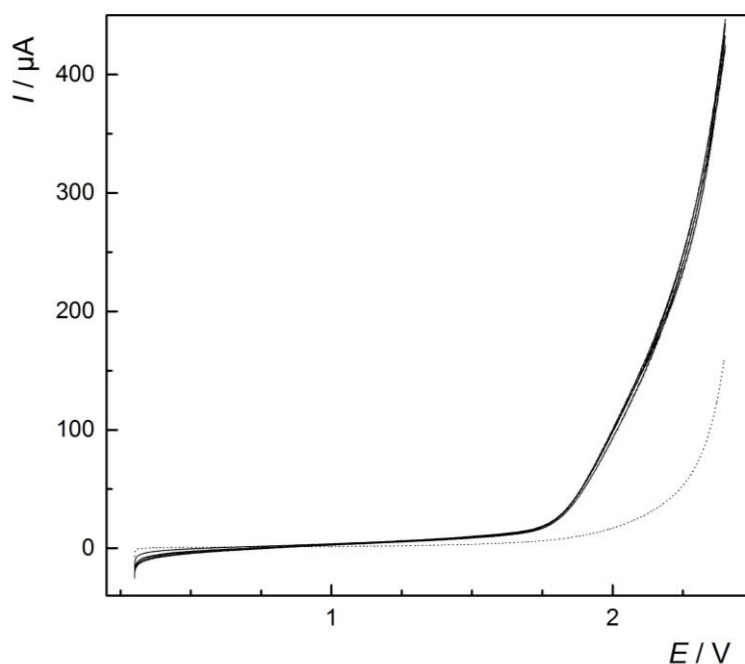
Měření vlivu vody na šíři potenciálového okna prokázala, že voda, především v nižších koncentracích (ve výřezu je na obr. 3.7 zvýrazněn základní elektrolyt a koncentrace vody 0,1 % v/v), výrazně nezužuje potenciálové okno, což umožňuje provádět měření ve smíšeném prostředí acetonitril:voda. Zastoupení vody 0,1 % je zvýrazněné proto, že je tato hodnota nejbližší zastoupení vody v roztocích použitých pro konstrukci kalibračních křivek žlučových kyselin (kap. 3.3.3.2).

3.3.2 Anodická a katodická předpříprava a aktivace elektrodového povrchu BDDE

Na následujících obrázcích jsou zobrazeny výsledky studia vlivu anodické a katodické předpřípravy a aktivace BDDE na oxidaci žlučových kyselin. Každý z těchto přístupů má svá pozitiva i negativa, ale v konečném důsledku se z důvodu reprodukovatelnosti voltamogramů jeví jako vhodnější udržovat elektrodu v oxidovaném stavu.

Anodická předpříprava elektrody proběhla v kyselině sírové vložení vysokého kladného potenciálu pro zoxidování elektrodového povrchu. Pro zajištění větší reprodukovatelnosti

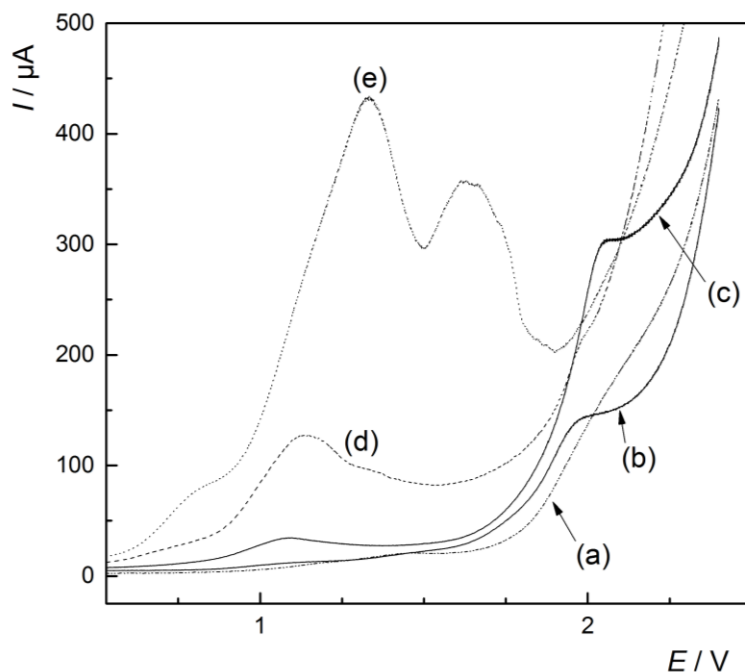
podmínek byla elektroda před každým měřením anodicky aktivována po uvedené časové rozsahy ve studovaném roztoku.



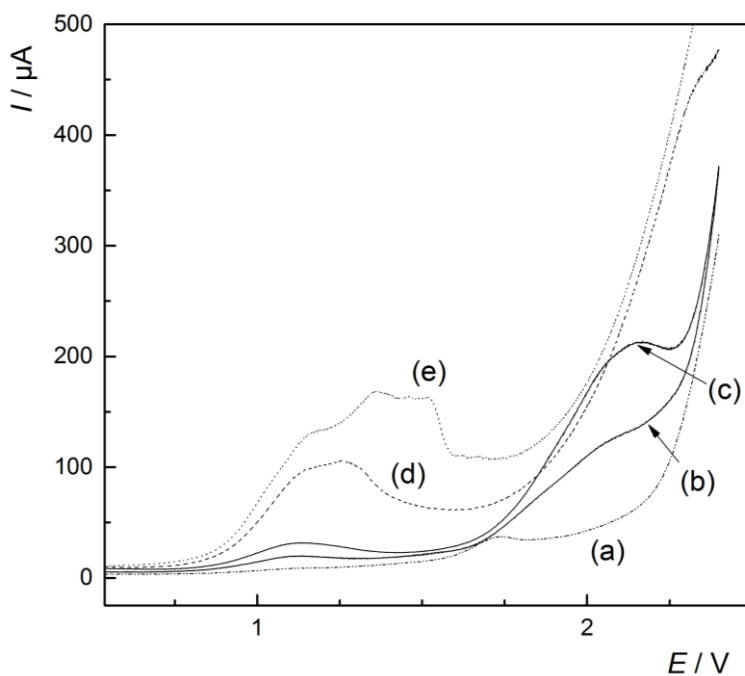
Obr. 3.8 LS voltamogramy lithocholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na anodicky předpřipravené BDD elektrodě. Zobrazeno je 5 křivek pro aktivace trvající 1 s, 5 s, 10 s, 30 s a 60 s. Koncentrace lithocholové kyseliny: $5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody $28,3 \text{ mm}^2$, potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.

Voltamogramy získané po anodické předpřípravě elektrody (obr. 3.8) ukazují, že přítomnost lithocholové kyseliny se projevuje prudkým nárůstem proudu u $+1,8 \text{ V}$, přičemž únik samotného základního elektrolytu se pohyboval okolo $+2,1 \text{ V}$. Měření na takto upraveném povrchu poskytují velmi reprodukovatelné křivky, nepřilíš závislé na délce aktivace. To je způsobeno tím, že se s elektrodou pracuje pouze v anodické oblasti, a proto povrch zůstává zoxidovaný a dobře definovaný. Na voltamogramech však není patrná žádná vlna či pík kyseliny, který by usnadňoval voltametrickou kvantifikaci.

Katodická předpříprava proběhla vložení katodického proudu na elektrodu v prostředí kyseliny sírové. Před záznamem každého voltamogramu byla pak elektroda opět aktivována, tentokrát katodicky, po uvedené časové rozsahy v měřeném roztoku.

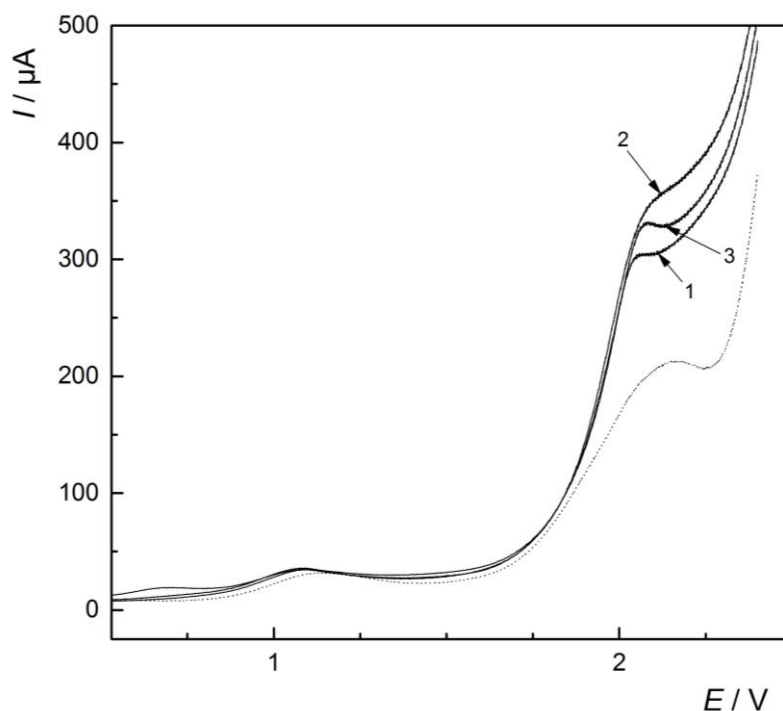


Obr. 3.9 LS voltamogramy lipocholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na katodicky aktivované BDD elektrodě. Zobrazeno je 5 křivek pro aktivace trvajících (a) 1 s, (b) 5 s, (c) 10 s, (d) 30 s, (e) 60 s. Koncentrace lipocholové kyseliny: $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (není zobrazen), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody $28,3 \text{ mm}^2$, 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 LS voltamogramy základní elektrolytu ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný) v prostředí acetonitrilu na katodicky aktivované BDD elektrodě. Zobrazeno je 5 křivek pro aktivace trvajících (a) 1 s, (b) 5 s, (c) 10 s, (d) 30 s, (e) 60 s, rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody $28,3 \text{ mm}^2$, potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.

LS voltamogramy zobrazené na obr. 3.9 (litocholová kyselina) a 3.10 (základní elektrolyt) ukazují křivky naměřené po katodické aktivaci elektrodového povrchu. Pro základní elektrolyt je zřejmé, že jeho únik se s rostoucím časem aktivace posouvá k nižším potenciálům a zvyrazňuje se signál mezi +1,0 a +1,2 V. Tyto jevy se vyskytují i na voltamogramech kyseliny litocholové, kde za povšimnutí stojí především voltamogramy naměřené po aktivaci trvající 5 a 10 s. Tyto voltamogramy poskytují dobře vyvinutou vlnu při potenciálu okolo +1,9 V, kterou by bylo možné využít pro analytickou aplikaci. Avšak nízká reprodukovatelnost takto naměřených křivek, ilustrovaná pro aktivaci trvající 10 s na obr. 3.11, neumožňuje přímou aplikaci katodické aktivace pro analytické stanovení litocholové kyseliny. Z průběhu voltametrických křivek základního elektrolytu lze usuzovat, že nedochází pouze k dějům zahrnujícím žlučovou kyselinu, ale i zredukovaný povrch elektrody, který je následně opět oxidován, což je obzvláště zřejmé pro delší doby aktivace (30 a 60 s).



Obr. 3.11 LS voltamogramy (tři měření) litocholové kyseliny v prostředí acetonitrilu na katodicky aktivované BDD elektrodě. Doba aktivace 10 s. Koncentrace litocholové kyseliny: $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody $28,3 \text{ mm}^2$, potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.

3.3.3 Měření ve směsných prostředích acetonitril:voda na BDDE

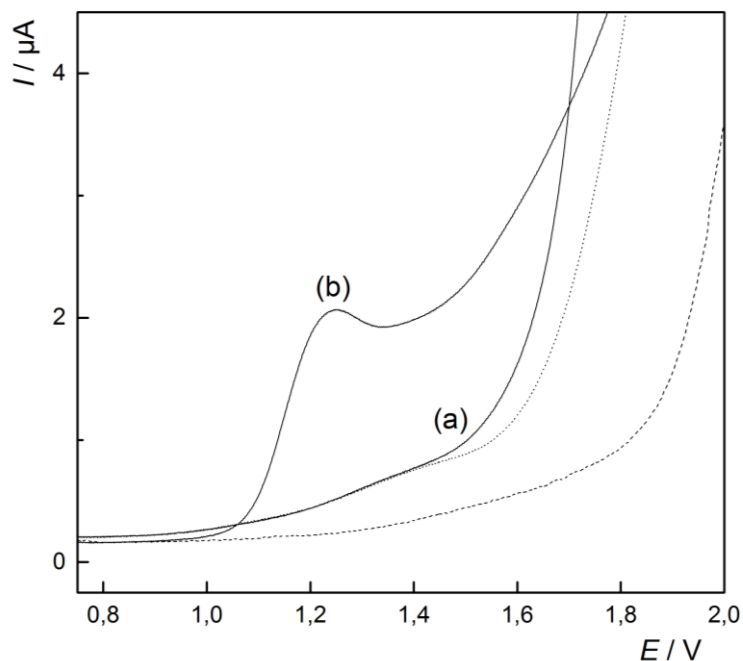
3.3.3.1 Vliv koncentrace vody a přítomnosti ferrocenu na elektrooxidaci žlučových kyselin

Směsné prostředí acetonitril:voda bylo na základě výsledků popsaných v kapitole 3.3.3.1 vyhodnoceno jako nejvhodnější pro elektrochemickou oxidaci žlučových kyselin. Elektroda byla při měřeních ve směsných prostředích udržována v oxidovaném stavu. Pro měření byly použity dvě sady roztoků základního elektrolytu (tab. 3.1), kdy v obou sadách byla zachována stejně stoupající koncentrace kyseliny chloristé, použité jako základní elektrolyt, ale obsahovaly jiné zastoupení vody. V dalším textu budou tato prostředí nazývána pro zjednodušení s nízkým (maximálně 1,29 %) a vysokým (maximálně 50 %) obsahem vody.

Tab. 3.1 Sady roztoků základního elektrolytu s nízkým a vysokým obsahem vody.

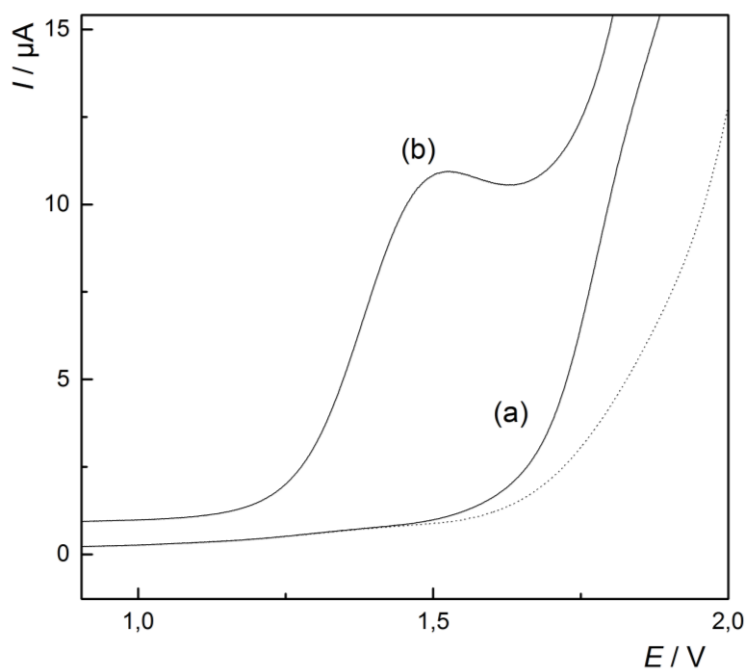
$c(\text{HClO}_4)$, [mol l ⁻¹]	„Nízký“ obsah vody, %	„Vysoký“ obsah vody, %
0,01	0,03	1
0,05	0,13	5
0,1	0,26	10
0,2	0,52	20
0,3	0,77	30
0,4	1,03	40
0,5	1,29	50

Oxidace žlučových kyselin se v těchto prostředích diametrálně odlišovala. Voltamogramy chenodeoxycholové kyseliny oxidované v prostředích se stejnou koncentrací kyseliny chloristé 0,1 mol l⁻¹, ale rozdílným zastoupením vody 10 % a 0,26 % jsou zobrazeny na obr. 3.12. Je zřejmé, že oxidace v prostředí s nízkým obsahem vody probíhala mnohem ochotněji a poskytla lépe vyhodnotitelný voltamogram s maximem při potenciálu okolo 1,2 V, než oxidace v prostředí s vysokým obsahem vody. Toto zjištění je zajímavé především z toho důvodu, že v literatuře byly žlučové kyseliny dodnes považovány za molekuly oxidovatelné jen velmi těžko, při výrazně vyšších potenciálech a nikdy neposkytovaly takto dobře vyvinutou vlnu [62].

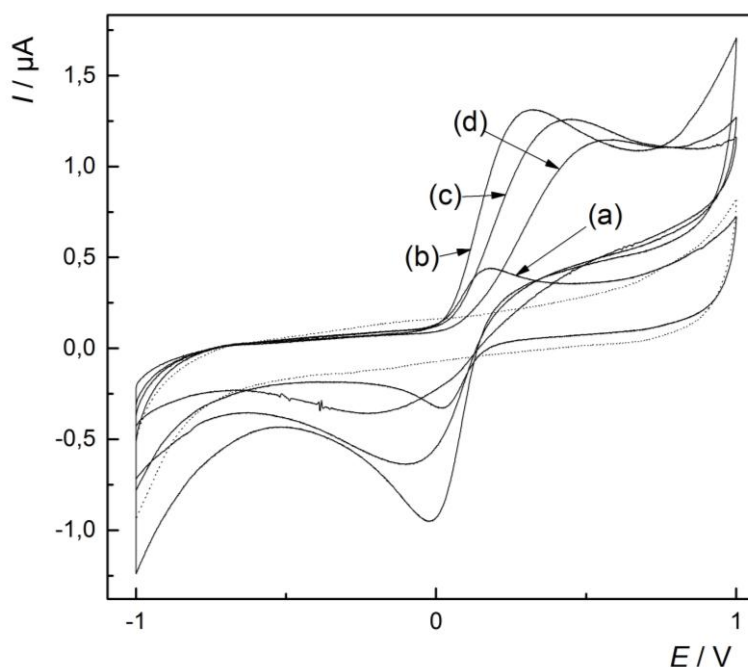


Obr. 3.12 LS voltamogramy chenodeoxycholové kyseliny ve smíšeném prostředí acetonitril:voda na BDD elektrodě. Zastoupení vody: (a) 10 %, (b) 0,26 % v/v. Koncentrace chenodeoxycholové kyseliny: 1×10^{-4} mol l^{-1} . Základní elektrolyt 0,1 mol l^{-1} kyselina chloristá (tečkovaná křivka pro 10 % a čárkovaná křivka pro 0,26 %), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody 7,1 mm², potenciál měřen proti Ag/0,01 mol l^{-1} AgNO₃/1 mol l^{-1} NaClO₄.

Zajímavá situace nastává tehdy, když se k roztoku žlučové kyseliny přidá ferrocen. Ten se pak chová jako mediátor elektronového přenosu a ulehčuje oxidaci chenodeoxycholové kyseliny, což je patrné z obr. 3.13. Je zřejmé, že i pro vyšší obsah vody 10 % byla v přítomnosti ferrocenu pro chenodeoxycholovou kyselinu získána klasická voltametrická odezva v podobě sigmoidálního píku při potenciálu okolo +1,5 V. Dochází tedy zřejmě k mediaci elektronového přenosu pomocí ferrocenu, jako v případě oxidace žlučových kyselin v přítomnosti chloridů na PbO₂ anodě [65]. Z obrázku 3.14 je patrné, že ferrocen s lithocholovou kyselinou interaguje – v její přítomnosti se zvyšuje jeho oxidační proud a se stoupající koncentrací lithocholové kyseliny se posouvá potenciál anodického píku do kladnějších hodnot. Ferrocen jako mediátor elektronového přenosu by mohl být využit pro analytickou praxi, avšak do studovaného roztoku zbytečně zavádí další reagenty, které je možné vyloučit využitím prostředí s nízkým obsahem vody. Možným pozitivem využití ferrocenu jako mediátoru by mohly být vyšší naměřené proudy (až pětinasobně) oproti prostředí s nízkým obsahem vody, což by eventuálně mohlo vést ke snížení mezí detekce. Další aplikací ferrocenu by mohla být možnost ulehčení oxidace žlučových kyselin neobsahujících oxidovatelné hydroxylové skupiny, jako například dehydrocholové kyseliny.



Obr. 3.13 LS voltamogramy chenodeoxycholové kyseliny ve smíšeném prostředí acetonitril:voda na BDD elektrodě v (a) nepřítomnosti a (b) přítomnosti $1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ferrocenu. Zastoupení vody: 10 % v/v. Koncentrace chenodeoxycholové kyseliny: $10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyselina chloristá (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody $7,1 \text{ mm}^2$, potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.



Obr. 3.14 Cyklické voltamogramy ferrocenu v prostředí acetonitrilu na BDD elektrodě. Koncentrace ferrocenu $1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Zobrazeny jsou křivky v (a) nepřítomnosti lithocholové kyseliny a v její přítomnosti o koncentraci (b) $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$, (c) v přítomnosti $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ a (d) v přítomnosti $10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ chloristan sodný (tečkovaně), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody $7,1 \text{ mm}^2$, potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.

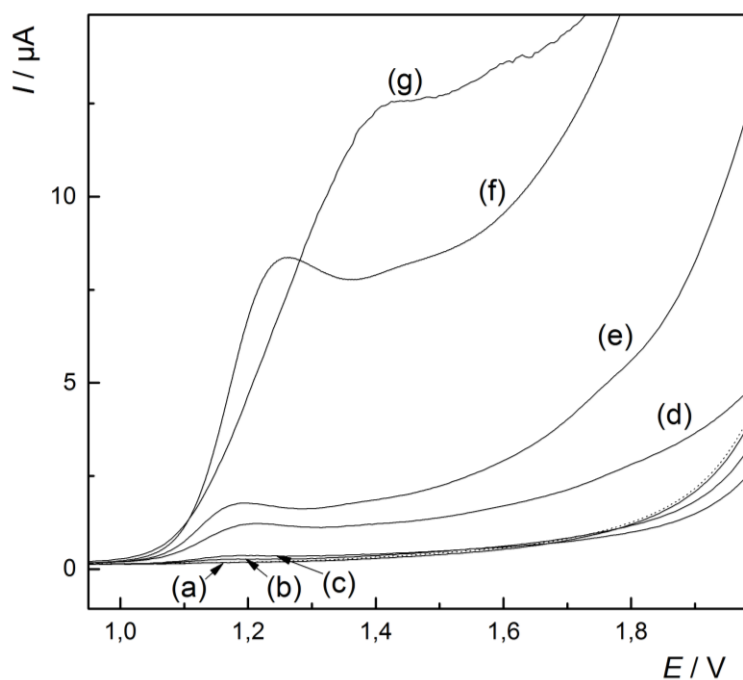
3.3.3.2 Kalibrační přímky stanovení žlučových kyselin

Na základě výše uvedených výsledků bylo tedy rozhodnuto, že pro stanovení žlučových kyselin na BDDE je nejvhodnější prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé jako základního elektrolytu s obsahem vody 0,26 %. V tomto prostředí byly naměřeny koncentrační závislosti v rozsahu 1×10^{-6} až 9×10^{-4} mol l⁻¹ (respektive 9×10^{-5} mol l⁻¹ pro kyseliny s nižší rozpustností). Ne vždy bylo možné do kalibrace zahrnout celý koncentrační rozsah, a to z toho důvodu, že pro velmi zředěné roztoky se voltametrická odezva kyseliny kryla se základním elektrolytem. Měření byla pro každou koncentraci vždy pětkrát opakována a pro konstrukci kalibračních přímek byl zvolen medián z těchto naměřených proudů. Rovnice kalibračních přímek a koncentrační rozsahy, pro které byly proloženy, jsou zobrazeny v tab. 3.2. Na následujících obrázcích jsou zobrazeny voltamogramy celého koncentračního rozsahu pro primární žlučové kyseliny chenodeoxycholovou (3.15) a cholovou (3.16). Rozpustnost cholové kyseliny v acetonitrilu je nižší než chenodeoxycholové, a proto chybí voltamogramy pro koncentrace 5×10^{-4} a 9×10^{-4} mol l⁻¹. Tyto dvě kyseliny poskytovaly oxidační signál při výrazně nižších potenciálech (okolo 1,2 V) než ostatní žlučové kyseliny a zároveň jako jediné ze studovaných látek mají ve své struktuře 7 α OH skupiny. Nabízí se tedy předpoklad, že OH skupinu v této pozici lze za daných podmínek na BDDE oxidovat snadněji než ostatní hydroxylové skupiny. To je v souladu s literaturou, kde je hydroxylová skupina na C₇ cholové kyseliny popsána také jako nejsnadněji oxidovatelná [65]. Tyto poznatky by mohly být využity při případném vývoji elektrochemického detektoru celkových primárních žlučových kyselin, které jsou ve své konjugované formě hlavními žlučovými kyselinami nacházejícími se v lidské žluči a spolu s kyselinami lithocholovou a deoxycholovou tvoří více než 90 % žlučových kyselin u člověka [69].

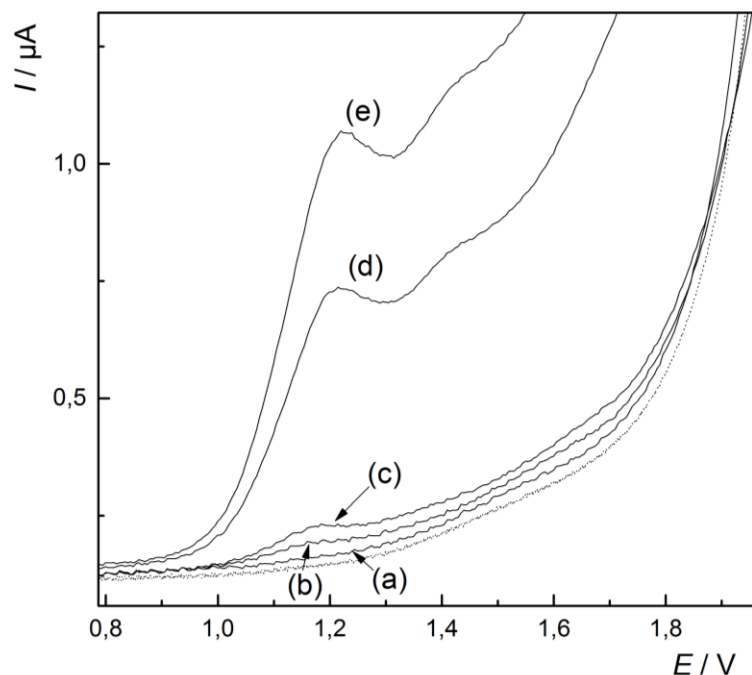
Meze detekce byly spočteny pro cholovou a chenodeoxycholovou kyselinu jako podíl trojnásobku amplitudy oscilací šumu signálu základního elektrolytu při potenciálu maxima oxidačního signálu kyseliny a směrnice kalibrační přímky. Pro cholovou kyselinu se LOD rovná $2,1 \times 10^{-6}$ mol l⁻¹ a pro chenodeoxycholovou pak $1,6 \times 10^{-6}$ mol l⁻¹.

Tab. 3.2 Rovnice kalibračních přímk pro stanovení studovaných žlučových kyselin LS voltametří na borem dopovaném diamantu v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,26% a příslušné regresní koeficienty.

žlučová kyselina	koncentrační rozsah [mol l ⁻¹]	rovnice kalibrační přímky	R ²
cholová	1×10 ⁻⁶ – 9×10 ⁻⁵	$I [\mu\text{A}] = 10500 \times c [\text{mol l}^{-1}]$	0,9892
chenodeoxycholová	1×10 ⁻⁶ – 9×10 ⁻⁴	$I [\mu\text{A}] = 13800 \times c [\text{mol l}^{-1}] + 0,3$	0,9872
litocholová	1×10 ⁻⁵ – 9×10 ⁻⁵	$I [\mu\text{A}] = 90100 \times c [\text{mol l}^{-1}] - 0,4$	0,9727
deoxycholová	1×10 ⁻⁶ – 9×10 ⁻⁵	$I [\mu\text{A}] = 84300 \times c [\text{mol l}^{-1}] + 0,9$	0,9864
ursodeoxycholová	5×10 ⁻⁵ – 9×10 ⁻⁴	$I [\mu\text{A}] = 20400 \times c [\text{mol l}^{-1}] + 0,4$	0,9843
tauroursodeoxycholová	1×10 ⁻⁵ – 9×10 ⁻⁵	$I [\mu\text{A}] = 26700 \times c [\text{mol l}^{-1}] - 0,2$	0,9999



Obr. 3.15 LS voltamogramy chenodeoxycholové kyseliny ve smíšeném prostředí acetonitril:voda na BDD elektrodě. Zastoupení vody: 0,26 % v/v. Koncentrace chenodeoxycholové kyseliny: (a) 1×10⁻⁶ mol l⁻¹, (b) 5×10⁻⁶ mol l⁻¹, (c) 1×10⁻⁵ mol l⁻¹, (d) 5×10⁻⁵ mol l⁻¹, (e) 9×10⁻⁵ mol l⁻¹, (f) 5×10⁻⁴ mol l⁻¹, (g) 9×10⁻⁴ mol l⁻¹. Základní elektrolyt 0,1 mol l⁻¹ kyselina chloristá (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 50 mV s⁻¹, plocha elektrody 7,1 mm², potenciál měřen proti Ag/0,01 mol l⁻¹ AgNO₃/1 mol l⁻¹ NaClO₄.



Obr. 3.16 LS voltamogramy cholové kyseliny ve směsném prostředí acetonitril:voda na BDD elektrodě. Zastoupení vody: 0,26 % v/v. Koncentrace cholové kyseliny: (a) $1 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $5 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, (c) $1 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (d) $5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (e) $9 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyselina chloristá (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody $7,1 \text{ mm}^2$, potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.

Žlučové kyseliny obsahující hydroxylové skupiny v pozici 7β (ursodeoxycholová a tauroursodeoxycholová), poskytovaly spíše náznak vlny při výrazně vyšších potenciálech okolo $1,8 \text{ V}$ (ilustrováno pro ursodeoxycholovou kyselinu na obr. 3.17). Kyseliny které C_7 hydroxylovou skupinu postrádají (deoxycholová a lithocholová) se oxidovaly při nejvyšších potenciálech (ilustrováno pro lithocholovou kyselinu na obr. 3.18). Potenciály maxima oxidačního signálu jsou pro vybrané žlučové kyseliny shrnuty v tab. 3.3.

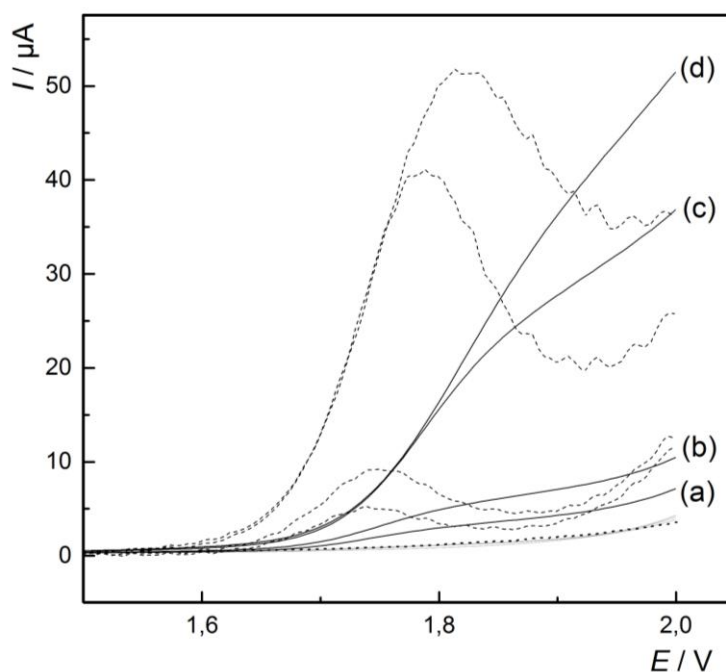
Za pomoci první derivace (na obr. 3.17 jako přerušované křivky) bylo možné nalézt inflexní body a použít proudy pro takto definovaný potenciál pro sestrojení koncentrační závislosti. Pro ursodeoxycholovou kyselinu také například platilo, že voltametrické křivky se až do koncentrace $5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ kryly s křivkou základního elektrolytu a nebylo možné je zahrnout do kalibrace.

Z důvodu oxidace ursodeoxycholové, tauroursodeoxycholové, deoxycholové a lithocholové kyseliny při vyšších potenciálech nebylo možné výše popsanou metodou spočítat meze detekce. Příčinou byl fakt, že v potenciálovém rozsahu jejich oxidace (oblast blízká

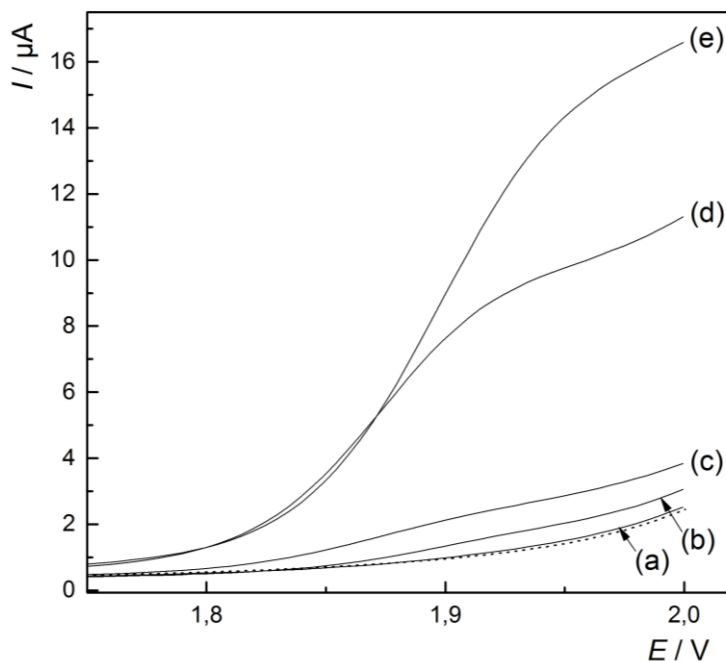
úniku základního elektrolytu) byl zaznamenán šum již prakticky nulový. Nejnižší měřitelné koncentrace pro tyto kyseliny jsou v rozsahu 1×10^{-6} až $5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

Tab. 3.3 Potenciály maxima oxidačního signálu vybraných žlučových kyselin na BDD elektrodě. Pro hvězdičkou označené kyseliny se jedná o potenciál maxima první derivace. Koncentrace kyselin $5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

žlučová kyselina	E oxidačního signálu, [mV]
cholová	+1220
chenodeoxycholová	+1210
lithocholová*	+1870
deoxycholová*	+1900
ursodeoxycholová*	+1740
tauroursodeoxycholová*	+1820

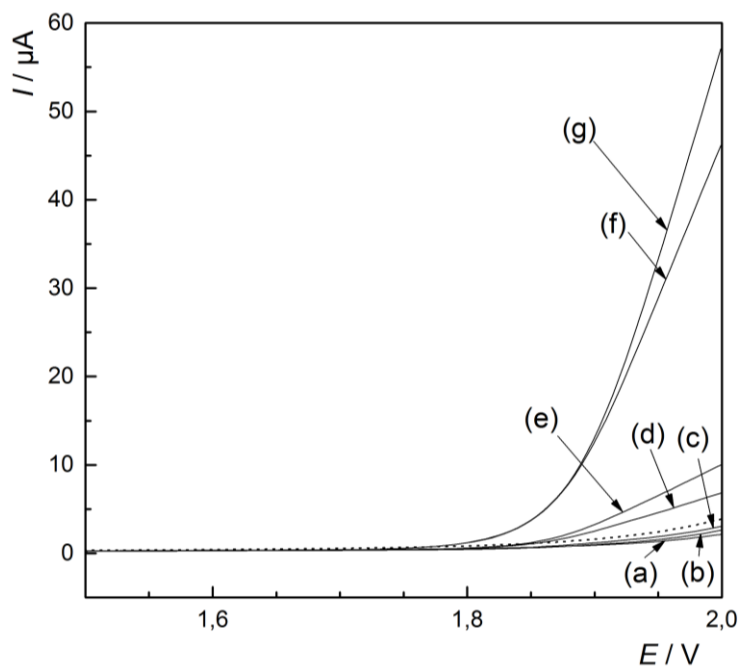


Obr. 3.17 LS voltamogramy ursodeoxycholové kyseliny ve smíšeném prostředí acetonitril:voda na BDD elektrodě. Zastoupení vody: 0,26 % v/v. Koncentrace ursodeoxycholové kyseliny: (a) $5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (b) $9 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, (c) $5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, (d) 9×10^{-4} . Křivky pro koncentrace překryté základním elektrolytem nejsou označeny. První derivace vybraných křivek čárkovaně. Základní elektrolyt $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyselina chloristá (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody $7,1 \text{ mm}^2$, potenciál měřen proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol l}^{-1} \text{ AgNO}_3/1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaClO}_4$.

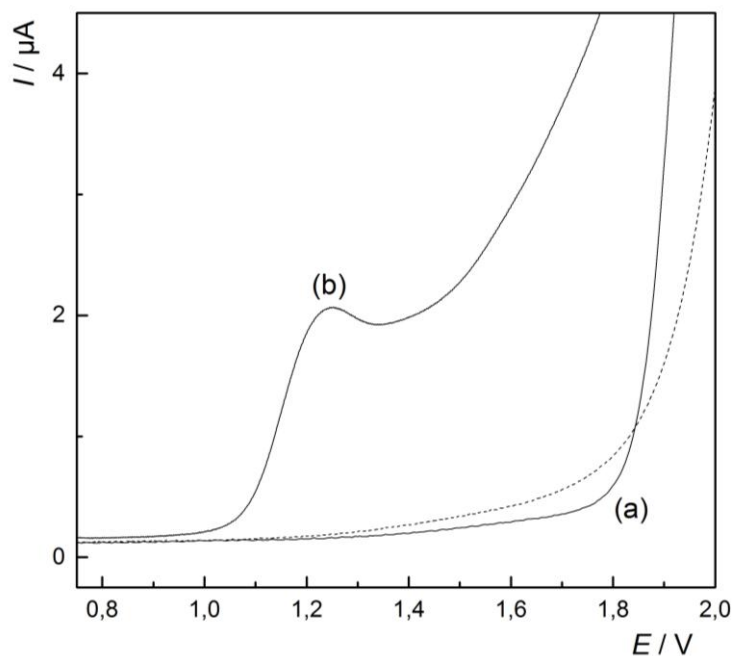


Obr. 3.18 LS voltamogramy lithocholové kyseliny ve smíšeném prostředí acetonitril:voda na BDD elektrodě. Zastoupení vody: 0,26 % v/v. Koncentrace lithocholové kyseliny: (a) 1×10^{-6} mol l^{-1} , (b) 5×10^{-6} mol l^{-1} , (c) 1×10^{-5} mol l^{-1} , (d) 5×10^{-5} mol l^{-1} , (e) 9×10^{-5} mol l^{-1} . Základní elektrolyt 0,1 mol l^{-1} kyselina chloristá (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody 7,1 mm², potenciál měřen proti Ag/0,01 mol l^{-1} AgNO₃/1 mol l^{-1} NaClO₄.

Voltametrické křivky dehydrocholové kyseliny (obr. 3.19) pak neposkytovaly žádné vlny, a proto nebylo možné vytvořit kalibrační přímkou. Porovnání voltamogramů chenodeoxycholové a dehydrocholové kyseliny o koncentraci 10^{-4} mol l^{-1} je zobrazeno na obr. 3.20. Chování dehydrocholové kyseliny je v souladu s její strukturou, protože má již všechny tři hydroxylové skupiny cholové kyseliny zoxidovány na ketoskupiny. Dochází pravděpodobně jen k oxidaci uhlíkového skeletu při výrazně pozitivních potenciálech.



Obr. 3.19 LS voltamogramy dehydrocholové kyseliny ve směsném prostředí acetonitril:voda na BDD elektrodě. Zastoupení vody: 0,26 % v/v. Koncentrace ursodeoxycholové kyseliny: : (a) 1×10^{-6} mol l^{-1} , (b) 5×10^{-6} mol l^{-1} , (c) 1×10^{-5} mol l^{-1} , (d) 5×10^{-5} mol l^{-1} , (e) 9×10^{-5} mol l^{-1} , (f) 5×10^{-4} mol l^{-1} , (g) 9×10^{-4} mol l^{-1} . Základní elektrolyt 0,1 mol l^{-1} kyselina chloristá (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody 7,1 mm², potenciál měřen proti Ag/0,01 mol l^{-1} AgNO₃/1 mol l^{-1} NaClO₄.



Obr. 3.20 LS voltamogramy (a) dehydrocholové a (b) chenodeoxycholové kyseliny ve směsném prostředí acetonitril:voda na BDD elektrodě. Zastoupení vody: 0,26 % v/v. Koncentrace kyselin: 10^{-4} mol l^{-1} . Základní elektrolyt 0,1 mol l^{-1} kyselina chloristá (tečkovaná křivka), rychlost polarizace 50 mV s^{-1} , plocha elektrody 7,1 mm², potenciál měřen proti Ag/0,01 mol l^{-1} AgNO₃/1 mol l^{-1} NaClO₄.

3.4 Preparativní elektrolýza na platinové elektrodě

Vybrané žlučové kyseliny byly na platinové elektrodě oxidovány ve dvou typech elektrochemické cely. V původním uspořádání (obr. 2.3, 1) unikal elektrolyt z referenční elektrody do oxidovaného roztoku, což bylo novým uspořádáním cely (obr. 2.3, 2) eliminováno.

Vlastnosti oxidačních produktů z původní nádoby a počty vyměňovaných elektronů, spočítaných z Faradayových zákonů elektrolýzy, jsou shrnuty v tab. 3.4. Ani v jednom případě neproběhla elektrolýza kvantitativně a kvantifikovat jednoduchým způsobem množství žlučových kyselin, které nepodlehly elektrolýze, v podstatě není možné. Výpočet počtu vyměňovaných elektronů je však založen na předpokladu kvantitativního výtěžku oxidace a je zamýšlen především jako ilustrace ochoty žlučových kyselin se oxidovat v daném experimentálním uspořádání. Ve všech případech kromě kyseliny dehydrocholové docházelo k nápadnému zbarvení roztoku v průběhu elektrolýzy.

Tab. 3.4 Vlastnosti produktů oxidace vybraných sloučenin v původní elektrochemické cele a vypočtený počet vyměňovaných elektronů n pro daný redoxní jev.

sloučenina	popis oxidačního produktu	n
litocholová kyselina	nažloutlý roztok, po odpaření nažloutlý produkt	0,2
cholesterol	v průběhu elektrolýzy roztok od růžové přes šedou až do modra, po odpaření namodralý produkt	0,3
cholová kyselina	nažloutlý roztok, po odpaření fialový produkt	0,4
chenodeoxycholová kyselina	nažloutlý roztok, po odpaření nažloutlý produkt	0,7
dehydrocholová kyselina	roztok bez zbarvení, nažloutlý produkt	0,3

Hodnoty počtu vyměňovaných elektronů ukazují, že oxidace v původní nádobce neprobíhala příliš ochotně, což potvrdily i následné TLC analýzy, kdy produkty nebylo možné vizualizovat (experimentálně určené retardační faktory čistých žlučových kyselin jsou uvedeny v tab. 3.6). Nukleární magnetická rezonance byla provedena pouze pro zamýšlený oxidační produkt litocholové kyseliny a taktéž jeho přítomnost nepotvrdila. Tato zjištění a výše uvedený problém s unikáním elektrolytu z referenční elektrody (tomu by mohly být přičítány i změny barvy roztoků) byly impulzem pro vývoj nové nádoby (obr. 2.3, 2), kde by nedocházelo ke kontaktu roztoku oxidovaných kyselin a referenčního elektrolytu. Vlastnosti

oxidačních produktů a počty vyměňovaných elektronů z této upravené nádoby jsou pro chenodeoxycholovou kyselinu k dispozici v tab. 3.5. Ani v tomto případě neproběhla elektrolýza kvantitativně, ale je zřejmé, že oxidace probíhala v tomto uspořádání lépe.

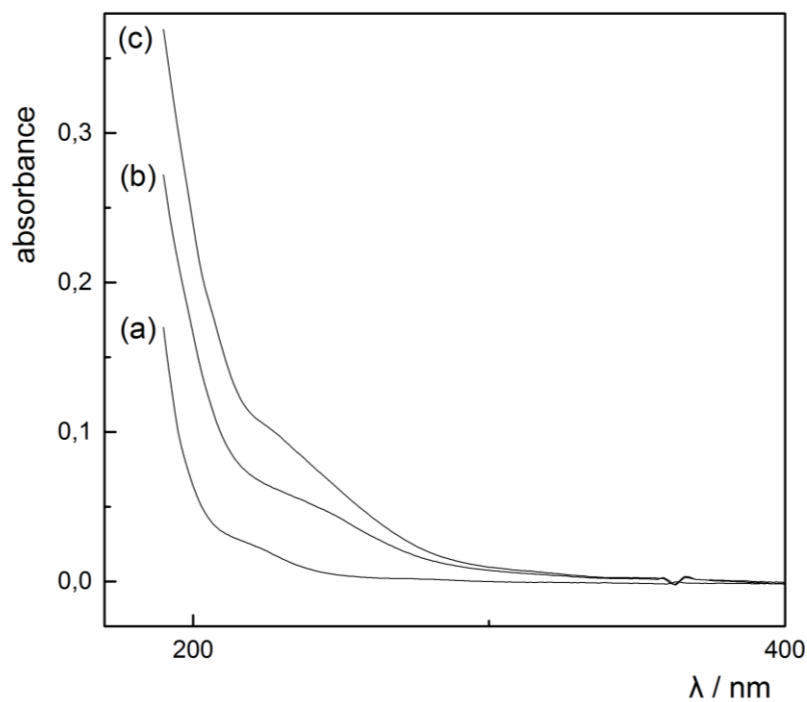
Tab. 3.5 Vlastnosti produktů oxidace vybraných sloučenin v upravené elektrochemické cele a vypočtený počet vyměňovaných elektronů n pro daný redoxní jev.

sloučenina	doba oxidace, [h]	popis oxidačního produktu	n
chenodeoxycholová kyselina	4,5	nažloutlý roztok, po odpaření nažloutlý produkt	2,9
chenodeoxycholová kyselina	8,5	nažloutlý roztok, po odpaření nažloutlý produkt	2,9

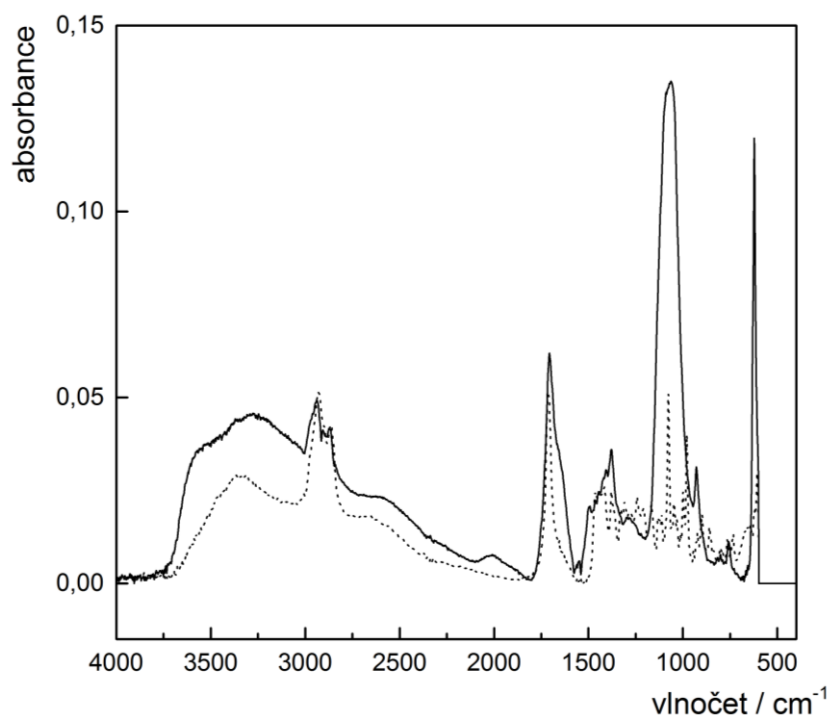
Tab. 3.6 Retardační faktory vybraných žlučových kyselin při TLC analýze. Stacionární fáze: Silpearl, mobilní fáze: směs isooktan:diethyl ether:*n*-butanol:kyselina octová v poměru 10:2,5:1:1 v/v.

žlučová kyselina	retardační faktor
cholová	0,24
chenodeoxycholová	0,07
litocholová	0,51
deoxycholová	0,27
ursodeoxycholová	0,18
tauroursodeoxycholová	0,00
dehydrocholová	0,14

Tenkovrstvá chromatografie produktů oxidace chenodeoxycholové kyseliny z nové nádoby prokázala přítomnost minimálně dvou látek, z čehož jedna vykazovala stejný retardační faktor jako standard chenodeoxycholové kyseliny a druhá, předpokládaný produkt/produkty, nevykazovala v použité mobilní fázi žádnou mobilitu a zůstala na startu. Ultrafialové spektrum standardu chenodeoxycholové kyseliny a jejího oxidačního produktu po elektrolýze je na obr. 3.21, infračervené pak na 3.22. Výsledky NMR analýzy nebyly v době sepisování práce ještě k dispozici.



Obr. 3.21 UV spektrum (a) $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ chenodeoxycholové kyseliny a odpovídajících oxidačních produktů po elektrolýze trvající (b) 4,5 h a (c) 8,5 h. Vzorky byly před spektrometrickým měřením $100\times$ zředěny.



Obr. 3.22 IČ spektrum chenodeoxycholové kyseliny (tečkovaně) a jejího oxidačního produktu po 8,5 h. Měřeno ve střední IČ oblasti $4000\text{--}600 \text{ cm}^{-1}$.

Z UV spekter je zřejmé, že v roztocích po elektrolýze přibyly absorbující látky v oblasti 200–300 nm. Posun při 1720 cm^{-1} v infračerveném spektru naznačuje přítomnost karbonylové skupiny na šestiuhlíkatém skeletu, což je v souladu s předpokladem oxidace hydroxylových skupin chenodeoxycholové kyseliny na keto skupiny. Tento předpoklad dokresluje fakt, že dochází ke snížení intenzity O-H valenční vibrace při 3700 cm^{-1} .

V minulosti byly MS/IČ/NMR analýzám podrobeny oxidační produkty cholesterolu. Ve smíšeném prostředí acetonitrilu a propan-2-olu s chloristanem lithným byl jako produkt oxidace na GCE navrhnut cholesta-4,6-dien-3-on [59]. V případě oxidace v prostředí dichloromethanu s tetrabutylamonium tetrafluoroborátem na platině byl produktem v poměrně velkém velkém výtěžku získán dimer cholesterolu dicholesteryl ether [70]. Vzniku složitějších struktur i v případě oxidace chenodeoxycholové kyseliny nahrává změna barvy roztoků v průběhu elektrolýzy a nulový posun na TLC v našich experimentech.

Je tedy zřejmé, že po elektrolýze lze separovat oxidační produkt/produkty chenodeoxycholové pomocí TLC a jasné změny jsou pozorovatelné i na UV a IČ spektru, avšak pro plnou identifikaci produktů bude nutné provedení dalších analýz, nejlépe kombinace hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetické rezonance a případně i infračervené spektrometrie.

4 Závěr

Tato diplomová práce si kladla za cíl prostudovat možnosti analytického využití přímé elektrochemické oxidace žlučových kyselin na vybraných elektrodových materiálech a pokusit se popsat základní parametry oxidačních produktů žlučových kyselin. Pro elektrochemická měření byly použity metody cyklické voltametrie a voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu (linear sweep voltametrie). Jako elektrodové materiály byly pro voltametriká měření využity vysoce orientovaný pyrolytický grafit, skelný uhlík a borem dopovaný diamant. Pro preparativní elektrolýzu byla použita velkoplošná platinová elektroda.

Bylo zjištěno, že v použitém uspořádání nebylo možné využít elektrodu z vysoce orientovaného pyrolytického grafitu, který je jako velmi křehký materiál silně náchylný k poškození a práce s ním vyžaduje dostatečnou experimentální zručnost a především zkušenost. Proto je možné, že negativní výsledky nebyly způsobeny samotnými vlastnostmi materiálu a lze doporučit provedení dalších experimentů pro konečné rozhodnutí o vhodnosti HOPG pro přímou elektrochemickou oxidaci žlučových kyselin.

Oxidace žlučových kyselin na elektrodě ze skelného uhlíku byla již potvrzena v minulosti, v této práci byla zmodifikována cyklodextriny, které jsou považovány za vhodný elektrodový modifikátor, který může zlepšit nespecifickou odezvu některých elektrod. V případě použitého β -cyklodextrinu však žádný pozitivní efekt nebyl pozorován. V budoucnu by bylo vhodné prostudovat vliv dalších cyklodextrinů a případně i jejich derivátů. V případě budoucích pozitivních výsledků na HOPG v nevodném prostředí lze doporučit i modifikaci tohoto snadno obnovitelného materiálu, který by díky jeho vlastnostem bylo možné modifikovat s rozumnými náklady různými cyklodextriny a následně studovat jejich vliv na oxidaci žlučových kyselin.

Na borem dopované diamantové elektrodě bylo dosaženo nejlepších, v této práci prezentovaných, výsledků. Nejprve byl studován vliv methanolu a vody na šíři potenciálového okna v nevodném prostředí acetonitrilu. Ukázalo se, že methanol nelze použít jako rozpouštědlo pro přípravu voltametriky studovaných roztoků žlučových kyselin, protože na BDDE dochází k jeho oxidaci a tím se značně snižuje šíře potenciálového okna. Voda, především v nízkých koncentracích, nijak výrazně nezužuje potenciálové okno. Dále bylo

přístupeno k experimentům s anodickou a katodickou předpřípravou elektrody v nevodném prostředí acetonitrilu a chloristanu sodného jako základního elektrolytu. Ukázalo se, že anodická předpříprava nepřináší žádný pozitivní efekt z hlediska selektivity metody a voltamogramy na takto aktivované elektrodě nevykazují ani náznak vlny či píku. Přítomnost kyselin se projevuje jako dřívější únik základního elektrolytu, jehož nárůst v nepřítomnosti kyseliny lze sledovat přibližně od potenciálu +2,1 V. Pozitivní byla velká reprodukovatelnost takto naměřených křivek. Při katodické předpřípravě dochází k redukci povrchu, který je následně při měření opět oxidován, což je zejména při delší době aktivace zřejmé z průběhu voltamterických křivek základního elektrolytu. Při vhodně zvolené době aktivace byla však pozorována dobře vyvinutá vlna okolo potenciálu okolo +1,9 V přisuzovaná oxidaci žlučových kyselin v oblasti vysoce pozitivních potenciálů. Problémem, který při katodické předpřípravě přetrvával, byla velmi nízká reprodukovatelnost naměřených voltamogramů. Dále se pokračovalo v práci na elektrodě s oxidovaným povrchem. Opravdu zajímavých výsledků bylo dosaženo ve smíšeném prostředí acetonitril:voda, kde byl obsah vody 0,26 %. V tom se primární žlučové kyseliny cholová a chenodeoxycholová oxidovaly okolo potenciálu +1,2 V, což nebylo dosud v literatuře popsáno. Lze očekávat, že toto chování je způsobeno snadněji oxidovatelnou hydroxylovou skupinou v pozici 7 α , kterou ze studovaných žlučových kyselin obsahovaly právě jen dvě zmiňované primární. Ostatní žlučové kyseliny podrobené měření ve smíšeném prostředí se oxidovaly při výrazně vyšších potenciálech mezi +1,7 a +1,9 V a zdaleka neposkytovaly tak dobře definovaný pík. Primární žlučové kyseliny vykazovaly zásadně rozdílné chování v prostředí, kde bylo zastoupení vody vyšší (pět a více procent), kdy nebyl zmiňovaný pík při relativně nízkých potenciálech vůbec patrný. Dále bylo zjištěno, že ferrocen přidaný do měřeného roztoku s vyšším obsahem vody se může chovat jako mediátor elektronového přenosu a poskytuje při oxidaci chenodeoxycholové kyseliny dobře vyvinutý pík při potenciálu okolo +1,5 V. Zjištění týkající se primárních žlučových kyselin, které tvoří významnou složku lidské žluči, by mohla být využita pro vývoj levného elektrochemického detektoru pro jejich stanovení. Byly naměřeny kalibrační přímky pro voltamtrické stanovení studovaných žlučových kyselin (s výjimkou dehydrocholové kyseliny) na BDDE v prostředí acetonitrilu s obsahem vody 0,26 %. Pro cholovou a chenodeoxycholovou kyselinu byly spočteny meze detekce. Pro cholovou kyselinu se LOD rovná $2,1 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ a pro chenodeoxycholovou pak $1,6 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.

Na velkoplošné platinové elektrodě byly zoxidovány následující žlučové kyseliny: lithocholová, cholová, chenodeoxycholová, dehydrocholová a také cholesterol. Jak bylo později zjištěno, aparatura nebyla dokonale navržena a proto bylo přistoupeno k její úpravě, díky které bylo dosaženo lepších výsledků. V nové aparatuře byla zoxidována chenodeoxycholová kyselina. Byla provedena TLC analýza elektrolyzovaného roztoku, která prokázala přítomnost oxidačního produktu/produktů. Produkt oxidace byl také studován pomocí ultrafialové a infračervené spektrometrie, avšak pro jeho identifikaci to nebylo dostatečné a bude nutné provést další analýzy metodami jako jsou nukleární magnetická rezonance a hmotnostní spektrometrie.

Literatura

- [1] Klouda J.: *Elektrochemická oxidace vybraných žlučových kyselin v acetonitrilu*. Bakalářská práce. Praha, Přírodovědecká fakulta UK 2013.
- [2] Patel K., Hashimoto K., Fujishima A.: Application of boron-doped CVD-diamond film to photoelectrode. *Denki Kagaku* **60** (1992), 659–661.
- [3] Swain G.M., Ramesham R.: The electrochemical activity of boron-doped polycrystalline diamond thin film electrodes. *Anal. Chem.* **65** (1993), 345–351.
- [4] Pecková K., Musilová J., Barek J.: Boron-doped diamond film electrodes: new tool for voltammetric determination of organic substances. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **39** (2009), 148–172.
- [5] De Barros R.D.C.M., Ribeiro M.C., An-Sumodjo P.T., Julião M.S.D.S., Serrano S.H.P., Ferreira N.G. Filmes de diamante CVD dopado com boro. *Quim. Nova* **28** (2005), 317–325. CA **2005**:313090.
- [6] Szunerits S., Boukherroub R.: Different strategies for functionalization of diamond surfaces. *J. Solid State Electrochem.* **12** (2008), 1205–1218.
- [7] Chailapakul O., Siangproh W., Tryk D.A.: Boron-doped diamond-based sensors: a review. *Sens. Lett.* **4** (2006), 99–119.
- [8] Compton R.G., Foord J.S., Marken F.: Electroanalysis at diamond-like and doped-diamond electrodes. *Electroanalysis* **15** (2003), 1349–1363.
- [9] Hupert M., Muck A., Wang J., Stotter J., Cvačková Z., Haymond S., Show Y., Swain G.M.: Conductive diamond thin-films in electrochemistry. *Diam. Relat. Mater.* **12** (2003), 1940–1949.
- [10] Barek J., Fischer J., Navrátil T., Pecková K., Yosypchuk B., Zima J.: Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds. *Electroanalysis* **19** (2007), 2003–2014.

- [11] Bairu S.G., Stefan R.-I., van Staden J.F.: Polycrystalline diamond-based electrochemical sensors and their applications in inorganic and organic analysis. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **33** (2003), 145–153.
- [12] Kraft A.: Doped diamond: A compact review on a new, versatile electrode material. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2** (2007), 355–385.
- [13] McCreery R.L.: Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chem. Rev.* **108** (2008), 2646–2687.
- [14] *Diamond Electrochemistry*. Fujishima A., Yasuaki E., Rao T.N., Tryk D.A (eds.) Amsterdam, Elsevier 2005.
- [15] Einaga Y., Foord J.S., Swain G.M.: Diamond electrodes: Diversity and maturity. *MRS Bull.* **39** (2014), 525–532.
- [16] Jones L. Thrower P.: Influence of boron on carbon fiber microstructure, physical properties, and oxidation behavior. *Carbon* **29** (1991), 251–269.
- [17] Cvačka J., Swain G.M., Barek J.: Stanovení aminonaftalenů a aminobifenyľů kapalinovou chromatografií s amperometrickou detekcí na diamantové filmové elektrodě. *Chem. List.* **96** (2002), 33–38.
- [18] Granger M.C., Witek M., Xu J., Wang J., Hupert M., Hanks A., Koppang M.D., Butler J.E., Lucazeau G., Mermoux M., Strojek J.W., Swain G.M.: Standard electrochemical behavior of high-quality, boron-doped polycrystalline diamond thin-film electrodes. *Anal. Chem.* **72** (2000), 3793–3804.
- [19] Swain G.M., Anderson A.B., Angus J.C.: Applications of diamond thin films in electrochemistry. *MRS Bull.* **23** (2013), 56–60.
- [20] Musilová J., Barek J., Pecková K.: The use of boron-doped diamond film electrodes for detection of organic compounds. *Chem. List.* **103** (2009), 469–478.
- [21] Xu J., Granger M.C., Chen Q., Strojek J.W., Lister T.E., Swain G.M.: Boron-doped diamond thin-film electrodes. *Anal. Chem.* **69** (1997), 591A–597A.
- [22] Ando T., Yamamoto K., Ishii M., Kamo M., Sato Y.: Vapour-phase oxidation of diamond surfaces in O₂ studied by diffuse reflectance Fourier-transform infrared and

- temperature-programmed desorption spectroscopy. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **89** (1993), 3635–3640.
- [23] Sarada B.V., Rao T.N., Tryk D.A., Fujishima A.: Electrochemical oxidation of histamine and serotonin at highly boron-doped diamond electrodes. *Anal. Chem.* **72** (2000), 1632–1638.
- [24] Kuo T.C.: Electrochemical modification of boron-doped chemical vapor deposited diamond surfaces with covalently bonded monolayers. *Electrochem. Solid-State Lett.* **2** (1999), 288–290.
- [25] Miller J.B., Brown D.W.: Photochemical modification of diamond surfaces. *Langmuir* **12** (1996), 5809–5817.
- [26] Pleskov Y.V.: Electrochemistry of diamond: A review. *Russ. J. Electrochem.* **38** (2002), 1275–1291.
- [27] Vosáhlová J.: *Borem dopované diamantové elektrody: Využití pro stanovení redukovatelných organických látek*. Diplomová práce. Praha, Přírodovědecká fakulta UK 2015.
- [28] Dennison J., Holtz M., Swain G.M.: Raman spectroscopy of carbon materials. *Spectroscopy* **11** (1996), 38–45.
- [29] Bard A.J., Faulkner L.R.: Studies at solid electrodes. In: *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. Harris D., Swain E. (eds.). New York, Wiley 2001, p. 559–561.
- [30] Swain G.M.: Solid electrode materials. Pretreatment and activation. In: *Handbook of Electrochemistry*. Zoski C.G. (ed.). Amsterdam, Elsevier, Amsterdam 2006, p. 114–147.
- [31] Brownson D.A.C., Banks C.E.: Graphene electrochemistry: an overview of potential applications. *Analyst* **135** (2010), 2768–2778.
- [32] Nagaoka T., Yoshino T.: Surface properties of electrochemically pretreated glassy carbon. *Anal. Chem.* **58** (1986), 1037–1042.

- [33] Szejtli J.: Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* **98** (1998), 1743–1753.
- [34] Ferancová A., Labuda J.: Cyclodextrins as electrode modifiers. *Fresenius. J. Anal. Chem.* (2001) **370**, 1–10.
- [35] Hernández-Muñoz L.S., Frontana C., González F.J.: Covalent modification of carbon surfaces with cyclodextrins by mediated oxidation of β -cyclodextrin monoanions. *Electrochim. Acta* **138** (2014), 22–29.
- [36] Egawa Y., Ishida Y., Yamauchi A., Anzai J., Suzuki I.: Recognition of bile acids at cyclodextrin-modified gold electrodes. *Anal. Sci.* **21** (2005), 361–366.
- [37] Björkhem I.: Mechanism of bile acid biosynthesis in mammalian liver In: *Sterols and Bile Acids*. H. Danielsson, J. Sjövall (eds.). Elsevier, Amsterdam 1985, 231–272.
- [38] 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, 345–397.
- [39] Hofmann A.F., Hagey L.R.: Bile acids: Chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci.* **65** (2008), 2461–2483.
- [40] Haslewood G.A.D.: Bile salt evolution. *J. Lipid Res.* **8** (1967), 535–550.
- [41] Armstrong M.J., Carey M.C.: The hydrophobic-hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities. *J. Lipid Res.* **23** (1982), 70–80.
- [42] 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 Res.* **33** (1992), 617–626.
- [43] Carey M.C., Small D.M. Micellar properties of dihydroxy and trihydroxy bile salts: effects of counterion and temperature. *J. Colloid Interface Sci.* **31** (1969), 382–396.
- [44] Madenci D., Egelhaaf S.U.: Self-assembly in aqueous bile salt solutions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15** (2010), 109–115.

- [45] 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.
- [46] Roda A., Hofmann A.F., Mysels K.: The influence of bile-salt structure on self association in aqueous solutions. *J. Biol. Chem.* **258** (1983), 6362–6370.
- [47] Kakiyama G., Muto A., Takei H., Nittono H., Murai T., Kurosawa T., Hofmann A.F., Pandak W.M., Bajaj J.S.: Development of a simple and accurate HPLC method for measurement of fecal bile acids: validation by GC-MS and LC-MS and application in healthy and cirrhotic patients. *J. Lipid Res.* **55** (2014), 978–990.
- [48] Griffiths W.J., Sjövall J.: Bile acids: analysis in biological fluids and tissues. *J. Lipid Res.* **51** (2010), 23–41.
- [49] Makin H.L.J., Honour J.W., Shackleton C.H.L.: Extraction, purification and measurement of steroids by high-performance liquid chromatography, gas-liquid chromatography and mass spectrometry. In: *Steroid Analysis*. Makin H.L.J., Gower D., Kirk D.N. (eds.) New York, Springer 2010, p. 137–141.
- [50] Gatti R., Roda A., Cerre C., Bonazzi D., Cavrini V.: HPLC-fluorescence determination of individual free and conjugated bile acids in human serum. *Biomed. Chromatogr.* **11** (1997), 11–15.
- [51] Hirano Y., Miyazaki H., Higashidate S., Nakayama F.: Analysis of 3-sulfated and nonsulfated bile acids by one-step solvolysis and high performance liquid chromatography. *J. Lipid Res.* **28** (1987), 1524–1529.
- [52] Kobayashi N., Oiwa H., Goto J.: Production and characterization of group-specific monoclonal antibodies recognizing nonamidated, glycine- and taurine- amidated ursodeoxycholic acid 7-N-acetylglucosaminides. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **64** (1998), 171–177.
- [53] Pecková K., Nesměrák 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, p. 87–96.

- [54] Ferri T., Campanella L., de Angelis G.: Differential-pulse polarographic determination of cholic acids. *Analyst* **109** (1984), 923–925.
- [55] Patáková A.: *Studium elektrochemické redukce kyseliny chenodeoxycholové na stacionárních elektrodách na bázi rtuti*. Bakalářská práce. Praha, Přírodovědecká fakulta UK 2013.
- [56] Rákosníková Š.: *Studium elektrochemické redukce kyseliny deoxycholové a ursodeoxycholové na rtuťové visící kapkové elektrodě*. Bakalářská práce. Praha, Přírodovědecká fakulta UK 2014.
- [57] Pišnová K.: *Využití rtuťových elektrod ke stanovení kyseliny tauroursodeoxycholové*. Bakalářská práce. Praha, Přírodovědecká fakulta UK 2013.
- [58] Zhu L., Xu L., Tan L., Tan H., Yang S., Yao S.: Direct electrochemistry of cholesterol oxidase immobilized on gold nanoparticles-decorated multiwalled carbon nanotubes and cholesterol sensing. *Talanta* **106** (2013), 192–199.
- [59] Hosokawa Y.Y., Hakamata H., Murakami T., Aoyagi S., Kuroda M., Mimaki Y., Ito A., Morosawa S., Kusu F.: Electrochemical oxidation of cholesterol in acetonitrile leads to the formation of cholesta-4,6-dien-3-one. *Electrochim. Acta.* **54** (2009), 6412–6416.
- [60] Hojo K., Hakamata H., 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.
- [61] Hojo K., Hakamata H., Kusu F.: Simultaneous determination of serum lathosterol and cholesterol by semi-micro high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* **879** (2011), 751–755.
- [62] 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.
- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] Medici A., Pedrini P., de Battisti A., Fantin G., Fogagnolo M., Guerrini A.: Anodic electrochemical oxidation of cholic acid. *Steroids* **66** (2001), 63–69.
- [66] 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.
- [67] Saar K., Müllner S.: Bile Compounds: Thin-Layer (Planar) Chromatography. In: *Encyclopedia of Separation Science*. Wilson I.D., Adlard E.R., Cooke M., Poole C.F (eds.). Academic Press 2000, p. 2135–2142.
- [68] Kapalka, A.; Lanova, B.; Baltruschat, H.; Foti, G.; Comninellis, C.: A DEMS study of methanol and formic acid oxidation on boron-doped diamond electrode. *J. Electrochem. Soc.* **156** (2009), 149–153.
- [69] Hofmann A.F.: The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch. Intern. Med.* **159** (1999), 2647–2658.
- [70] Kowalski J., Łotowski Z., Morzycki J.W., Płoszyńska J., Sobkowiak A., Wilczewska A.Z.: Unusual electrochemical oxidation of cholesterol. *Steroids*. **73** (2008), 543–548.