

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



**Bc. Polina Yershova**

**Studium redoxních a adsorpčních vlastností žlučových kyselin  
na rtuťové visící kapkové elektrodě**

Study of redox and adsorption features of bile acids on hanging mercury  
drop electrode

Diplomová práce

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

Konzultant: Mgr. Lukáš Fojt, Ph.D.

Praha, 2020

## **Prohlášení**

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

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

V Praze dne 15.06.2020

## Abstrakt

Žlučové kyseliny jsou konečné produkty metabolismu cholesterolu a jsou důležitými biologickými povrchově aktivními látkami. Zakřivený tvar jejich řetězců umožňuje cyklizaci molekul, a tím i tvorbu supramolekulární struktury.

Cílem této diplomové práce byl studium elektrochemického a adsorpčního chování vybraných žlučových kyselin: kyseliny lithocholové, kyseliny deoxycholové a kyseliny cholové. Měření probíhala v prostředí Brittonův-Robinsonův pufr:metanol v poměru 9:1 za použití metod cyklické voltametrie, AC voltametrie a měření závislosti diferenciální kapacity  $C_d$  na vloženém potenciálu  $E$ . Jako pracovní elektroda byla použita visící rtuťová kapková elektroda.

Měření prokázala, že se žlučové kyseliny adsorbují na povrchu elektrody, kde dochází k tvorbě samouspořádaných vrstev, v našem případě ke 2D kondenzaci (speciální forma somouspořádaných vrstev). Pro důkaz existence adsorpce žlučových kyselin byly použity transferové techniky.

Studium chování kyseliny lithocholové v závislosti na různých hodnotách pH ukázalo, že pouze při pH 10,0 až 12,0 se jedná o 2D kondenzaci, to znamená, že při hodnotách pH v rozmezí 2,0 až 9,0 jde o jiný druh adsorpce. Na AC voltamogramech se nacházejí maximálně dvě oblasti, ve kterých se vyskytují píky: první je kolem  $-0,2$  V a druhá je kolem  $-1,2$  V až  $-1,4$  V. Oba píky jsou srovnatelné s píky na cyklickém voltamogramu.

Měření teplotní závislosti diferenciální kapacity na potenciálu bylo provedeno pro tři koncentrace žlučových kyselin ( $c$  ( $\text{mol l}^{-1}$ ) =  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ). K 2D kondenzaci u LCA dochází pro obě vyšší koncentrace. Při koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$   $\text{mol l}^{-1}$  je 2D kondenzace v náznaku pouze u nejnižších teplot, ale stále je pozorovatelná silná adsorpce. DCA a CA se na elektodu adsorbují, ale k 2D kondenzaci dochází pouze pro nižší teploty při vyšších koncentracích.

Studium vlivu přítomnosti aniontů v základním elektrolytu na adsorpční chování žlučových kyselin ukázalo, že interakce žlučových kyselin s povrchem elektrody a mezi sebou je jiná, než jsou vodíkové můstky. Vzhledem ke struktuře žlučových kyselin lze předpokládat, že se jedná o hydrofobní interakce.

Všechna měření ukázala, že 2D kondenzace u LCA je výraznější oproti DCA a CA.

## Abstract

Bile acids are the end products of cholesterol metabolism and are important biological surfactants. The curved shape of their chains allows the cyclization of molecules, and the formation of a supramolecular structure.

The goal of this thesis was to study the electrochemical and adsorption behavior of selected bile acids: lithocholic, deoxycholic and cholic acids. The measurements were carried out in the medium Britton-Robinson buffer:methanol in the ratio 9:1 using cyclic voltammetry and AC voltammetry methods and measuring the dependence of the differential capacitance  $C_d$  on the applied potential  $E$ . A hanging mercury drop electrode was used as a working electrode.

The measurements showed that bile acids are adsorbed on the surface of the electrode and organizing themselves in self assembled monolayers (SAM). In our case we have observed formation of 2D condensed layers as specific form of SAM. Transfer techniques were used to demonstrate bile acid adsorption.

A study of the behavior of lithocholic acid as a function of different pH values showed that only at pH 10.0 to 12.0 2D 2D condensation occurs, i. e. that at pH values in the range of 2.0 to 9.0 it is another type of adsorption. On AC voltammograms, there are a maximum of two areas in which peaks occur: the first is around  $-0.2$  V and the second is around  $-1.2$  V to  $-1.4$  V. Both peaks are comparable to the peaks on a cyclic voltammogram.

The measurement of the temperature dependence of the differential capacity on the potential was performed for three concentrations of bile acids ( $c$  ( $\text{mol l}^{-1}$ ) =  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ). 2D condensation in LCA occurs for both higher concentrations. At a concentration of  $5 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{l}^{-1}$ , 2D condensation is only indicative at the lowest temperatures, but strong adsorption is still observable. DCA and CA are adsorbed on the electrode, but 2D condensation occurs only for lower temperatures at higher concentrations.

A study of the effect of the presence of anions in the basic electrolyte on the adsorption behavior of bile acids showed that the interaction of bile acids with the electrode surface and with each other is different from hydrogen bonds. Due to the structure of bile acids, it can be assumed that these are hydrophobic interactions.

All measurements showed that 2D condensation in LCA is more strong than in DCA and CA.

## **Klíčová slova**

adsorpce

kapacitní jáma

rtuťová visící kapková elektroda

voltametrie

žlučové kyseliny

## **Key words**

adsorption

bile acids

capacitance pit

hanging mercury drop electrode

voltammetry

## **Poděkování**

Tato práce vznikla s podporou Grantové agentury České republiky (projekt 19-11268S). Na úvod bych chtěla poděkovat své školitelce doc. RNDr. Karolině Schwarzové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, za její trpělivost a čas, který mi věnovala při práci v laboratoři i při sepisování práce.

Také bych ráda poděkovala svému konzultantovi Mgr. Lukáši Fojtovi, Ph.D. z Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně za všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

Dále bych chtěla poděkovat kolektivu laboratoří č. 114, své rodině a svým přátelům za jejich podporu a trpělivost.



## Obsah

Seznam zkratk a použitých symbolů .....	11
1. Úvod .....	12
1.1. Cíl práce .....	12
1.2. Žlučové kyseliny .....	12
1.3. Studované látky .....	16
1.3.1. Kyselina lithocholová .....	17
1.3.2. Kyselina deoxycholová .....	18
1.3.3. Kyselina cholová .....	19
1.4. Biosyntéza žlučových kyselin .....	20
1.5. Funkce a využití žlučových kyselin .....	21
1.6. Metody stanovení žlučových kyselin .....	21
1.6.1. Chromatografické metody .....	22
1.6.2. Enzymatické metody .....	22
1.6.3. Elektrochemické metody a senzory .....	23
1.7. Visící rtuťová kapková elektroda .....	24
1.8. Elektrochemické metody a adsorpce organických látek na povrch elektrody...25	
1.8.1. AC voltametrie .....	26
1.8.2. Měření závislosti diferenciální kapacity $C_d$ na vloženém potenciálu $E$ ...26	
2. Experimentální část .....	27
2.1. Studovaná látka .....	27
2.2. Použité chemikálie .....	27
2.3. Příprava roztoku .....	27
2.3.1. Zásobní roztoky žlučových kyselin .....	27
2.3.2. Pufry .....	27
2.4. Metody měření a přístroje .....	28
2.4.1. Voltametrická měření .....	28
2.5. Vyhodnocení výsledků .....	29
3. Výsledky a diskuze .....	30
3.1. Vliv pH prostředí na chování lithocholové kyseliny .....	30
3.1.1. Cyklická voltametrie.....	30
3.1.2. AC voltametrie.....	33

3.2. Koncentrační závislost .....	36
3.3. Transferové techniky pro ověření adsorpce.....	39
3.4. Teplotní závislost diferenciální kapacity na potenciálu.....	43
3.5. Vliv přítomnosti aniontů v základním elektrolytu na adsorpční chování žlučových kyselin.....	47
Závěr .....	54
Literatura .....	56

## Seznam zkratek a použitých symbolů

ACV	<i>alternating current</i> voltametrie
BR pufr	Brittonův – Robinsonův pufr
$c$	molární koncentrace
CA	cholová kyselina ( <i>cholic acid</i> )
$C_d$	diferenciální kapacita
CDCA	chenodeoxycholová kyselina ( <i>chenodeoxycholic acid</i> )
CMC	kritická micelární koncentrace
CV	cyklická voltametrie
DCA	deoxycholová kyselina ( <i>deoxycholic acid</i> )
$E$	potenciál [V]
$E_p$	potenciál píku [V]
$E_{pzc}$	potenciál elektrokapilárního maxima
GC	plynová chromatografie
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$I$	proud [ $\mu$ A]
LCA	litocholová kyselina ( <i>lithocholic acid</i> )
MS	hmotnostní spektrometrie
NBT	nitrotetrazoliová modř
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
$pK_a$	záporný dekadický logaritmus kyselé disociační konstanty
$T_{krit}$	kritická kondenzační teplota

# 1. Úvod

## 1.1. Cíl práce

Tato diplomová práce vznikla na základě výzkumného projektu, který se věnuje studiu redoxních vlastností steroidních sloučenin a jejich interakcemi s elektrodovými povrchy. V rámci projektu jsou vyvíjeny i elektroanalytické metody pro detekci steroidů.

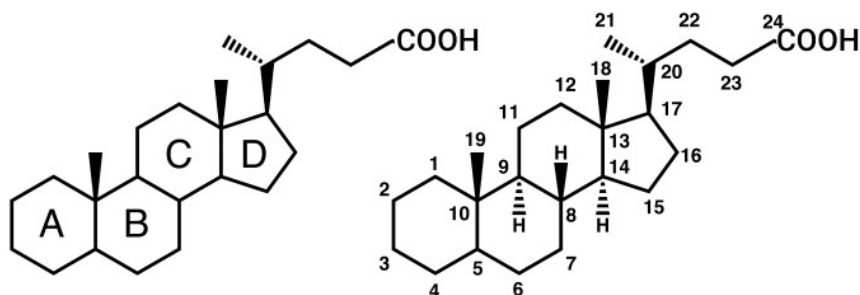
Cílem této diplomové práce je studium elektrochemického a adsorpčního chování vybraných žlučových kyselin: kyseliny lithocholové, kyseliny deoxycholové a kyseliny cholové na visící rtuťové kapkové elektrodě za použití metod cyklické voltametrie, AC (*alternating current*) voltametrie a měření diferenciální kapacity elektrodové dvojvrstvy na vloženém potenciálu. Tyto kyseliny se liší počtem hydroxylových skupin na steroidním skeletu, a proto byly vybrány jako modelové sloučeniny pro výše zmíněné studie.

## 1.2. Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny byly izolovány ze žluče v 19. století. Jejich struktura ale byla objasněna až po roce 1932, a proto je řada žlučových kyselin pojmenována podle organismu, ze kterého byla izolována. Příkladem je ursodeoxycholová kyselina: *ursus* (latinsky) – medvěd nebo vulpecholová kyselina: *vulpecula* (latinsky) – vačice [1– 3].

Žlučové kyseliny jsou konečné produkty metabolismu cholesterolu. Jeho degradací v játrech vznikají primární žlučové kyseliny, mezi které patří cholová kyselina (CA) a chenodeoxycholová kyselina (CDCA). Sekundární žlučové kyseliny, jako například lithocholová (LCA) a deoxycholová kyselina (DCA), vznikají ve střevě z primárních žlučových kyselin činností bakterií [1].

Základem molekuly je steroidní jádro, které se skládá ze tří šestiuhlíkatých kruhů (označovány A, B, C) a jednoho pětiuhlíkatého kruhu (označován D), a krátký alifatický postranní řetězec na C17 (obr. 1).



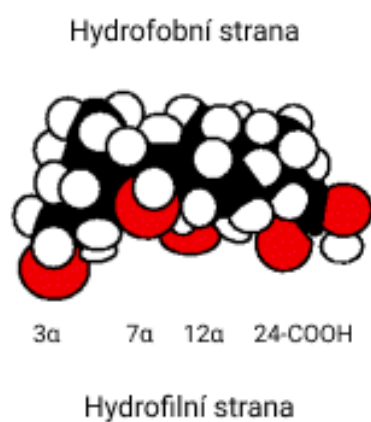
**Obr. 1** Základní struktura žlučových kyselin – systém značení kruhů steroidního jádra (vlevo) a číslování jednotlivých pozic atomů uhlíku (vpravo). Převzato a upraveno z [4].

Žlučové kyseliny se od sebe liší pozicí a množstvím hydroxylových skupin, u savců jsou tyto nejčastěji umístěny na pozici C3, C7 a C12, a také délkou postranního řetězce, který je navázán na pozici C17. Podle délky postranního řetězce navázaného na kruh D jsou žlučové kyseliny rozdělovány na cholanové žlučové kyseliny s celkovým počtem uhlíků dvacet čtyři (tzv.  $C_{24}$  kyseliny) a cholestanové žlučové kyseliny s celkovým počtem uhlíků dvacet sedm ( $C_{27}$  kyseliny) [5, 6]. Chemické struktury vybraných žlučových kyselin jsou shrnuté v tab. 1. U savců jsou nejvíce zastoupeny  $C_{24}$  žlučové kyseliny, které u člověka téměř vždy tvoří konjugáty s taurinem a glycinem [7].

**Tab.1** Přehled chemických struktur vybraných žlučových kyselin [5].

Žlučová kyselina	A kruh	B kruh	C kruh	D kruh
				$17C(CH_3)CH_2CH_2COR$
Cholová kyselina	$3\alpha OH$	$7\alpha OH$	$12\alpha OH$	$R=OH$
Deoxycholová kyselina	$3\alpha OH$		$12\alpha OH$	$R=OH$
Litocholová kyselina	$3\alpha OH$			$R=OH$
Chenodeoxycholová kyselina	$3\alpha OH$	$7\alpha OH$		$R=OH$
Ursodeoxycholová kyselina	$3\alpha OH$	$7\beta OH$		$R=OH$
Ursocholová kyselina	$3\alpha OH$	$7\beta OH$	$12\alpha OH$	$R=OH$

Žlučové kyseliny jsou amfipatické molekuly. V prostoru se stáčí tak, že mají hydrofobní stranu ( $\beta$ ) neobsahující žádné substituenty a hydrofilní stranu ( $\alpha$ ) obsahující hydroxylové skupiny. Pro kyselinu cholovou je toto znázorněno na obr. 2. Hydrofilita žlučových kyselin roste s rostoucím počtem hydroxyskupin a je taky ovlivněna jejich orientací. Pokud se hydroxylové skupiny nacházejí v pozici  $\beta$ , molekula žlučové kyseliny je více hydrofilní než žlučová kyselina, ve které jsou hydroxyskupiny orientovány v pozici  $\alpha$ . Rozpustnost žlučových kyselin ve vodě je v rozmezí 0,05 až 300  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a je výrazně ovlivněna hodnotou pH prostředí díky přítomnosti karboxylové skupiny ve struktuře žlučové kyseliny [5, 7, 8].



**Obr. 2** Prostorová struktura cholové kyseliny. Převzato a upraveno z [9].

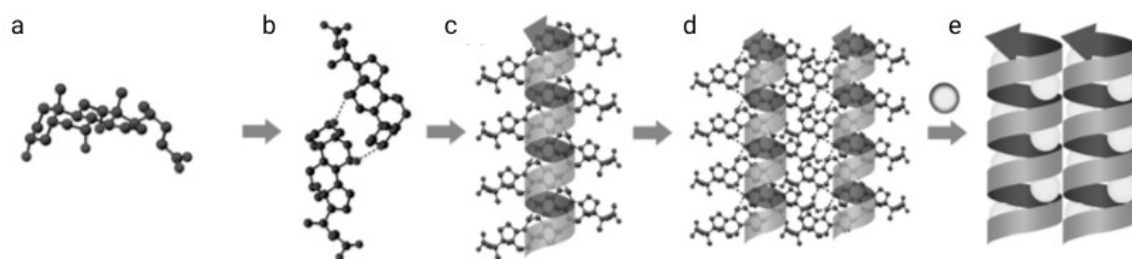
Žlučové kyseliny při koncentracích vyšších, než je jejich kritická micelární koncentrace (CMC), tvoří ve vodném prostředí micely. Tvorba micel je podmíněna hydrofobním efektem a taky tvorbou vodíkových můstků mezi hydroxylovými skupinami. Obecně platí, že s rostoucím počtem hydroxylových skupin rostou hodnoty CMC. Souvisí to i s jejich vyšší rozpustností [10, 11]. Hodnoty rozpustnosti ve vodě, CMC a  $pK_a$  pro studované žlučové kyseliny jsou shrnuty v tab. 2.

**Tab.2** Hodnoty rozpustnosti ve vodě, kritické micelární koncentrace (CMC) a pKa pro vybrané žlučové kyseliny [12 – 17].

Žlučová kyselina	Rozpustnost ve vodě [ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]	CMC ve vodě [ $\text{mmol l}^{-1}$ ]	pKa
Cholová kyselina	273	13	5,2
Deoxycholová kyselina	28	10	6,2
Litocholová kyselina	0,05	0,9	4,8
Chenodeoxycholová kyselina	27	9	6,2
Ursodeoxycholová kyselina	9	19	5,1
Ursocholová kyselina	1670	60	4,5

Žlučové kyseliny jsou schopné vytvářet supramolekulární struktury. Charakteristickým rysem většiny žlučových kyselin je cis konfigurace A a B kruhu steroidního jádra. Žlučové kyseliny s touto konfigurací jsou označovány jako 5 $\beta$  žlučové kyseliny. Jejich řetězec má zakřivený tvar, který umožňuje cyklizaci molekul. Spojení steroidních jader je zprostředkováno pomocí takzvaných spacerů. Spacer je navázán na steroidní kruh první žlučové kyseliny do polohy 3 a alifatický řetězec druhé žlučové kyseliny [18 – 21].

Steroidní molekuly mohou také vytvářet hierarchickou strukturu, zahrnující primární, sekundární a terciární strukturu (obr. 3). Steroidní molekuly samy o sobě představují primární struktury (obr. 3a). Molekuly žlučových kyselin tvoří dimery (obr. 3b), které se následně uspořádávají do šroubovice – sekundární struktura (obr. 3c). Propojením několika šroubovic vzniká terciární struktura (obr. 3d). Při tomto spojení mohou vznikat organizované útvary s kanálkem nebo jádrem, do kterého se mohou navázat hydrofilní molekuly. Tyto komplexy představují kvarterní strukturu (obr. 3e), která umožňuje přepravit hydrofilní látky přes lipidovou dvojvrstvu membrán. Toho lze využít například k transportu léčiv [22].



**Obr. 3** Hierarchická struktura žlučových kyselin: (a) primární struktura, (b, c) sekundární struktura, (d) terciární struktura (e) kvarterní struktura. Převzato z [22].

### 1.3. Studované látky

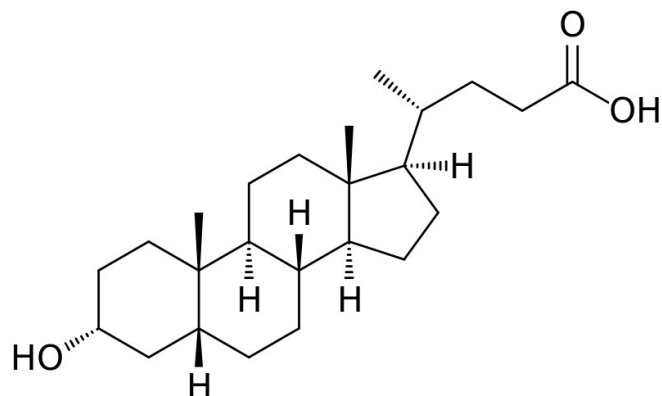
V této diplomové práci byly studovány tři žlučové kyseliny, které se od sebe liší počtem hydroxylových skupin:

- kyselina lithocholová (LCA), která má jednu hydroxylovou skupinu v poloze  $3\alpha$
- kyselina deoxycholová (DCA), která má dvě hydroxylové skupiny v polohách  $3\alpha$  a  $12\alpha$
- kyselina cholová (CA), která má tři hydroxylové skupiny v polohách  $3\alpha$ ,  $7\alpha$  a  $12\alpha$ .



### 1.3.1. Kyselina litocholová

Strukturální vzorec kyseliny litocholové (LCA) je zobrazen na obr. 4. Vybrané charakteristické vlastnosti a možnosti využití jsou shrnuty v tab. 3.



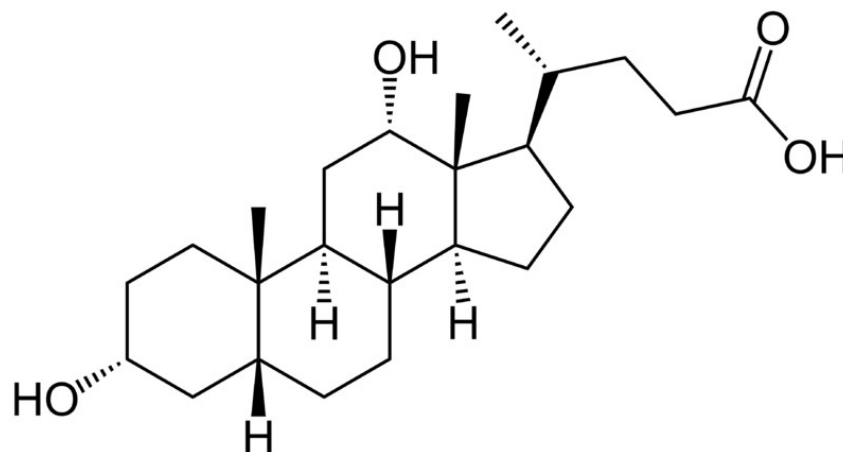
**Obr. 4** Strukturální vzorec kyseliny litocholové. Převzato z [23].

**Tab. 3** Vlastnosti a možnosti využití kyseliny litocholové [24 – 27].

Anglický název	Lithocholic acid
Název dle IUPAC	(4R)-4-[(3R,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-hydroxy-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoic acid
Sumární vzorec	$C_{24}H_{40}O_3$
Molekulová hmotnost	$376,6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Teplota tání	$184 - 186 \text{ }^\circ\text{C}$
Barva	Bílý prášek
Využití	Protizánětlivá látka, chloretikum, látka k terapii neuroblastomů, aktivace receptorů vitamínu D

### 1.3.2. Kyselina deoxycholová

Strukturální vzorec kyseliny deoxycholové (DCA) je zobrazen na obr. 5. Vybrané charakteristické vlastnosti a možnosti využití jsou shrnuty v tab. 4.



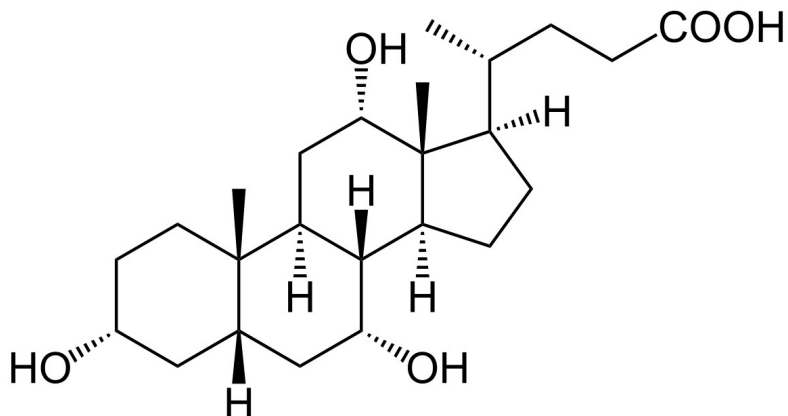
**Obr. 5** Strukturální vzorec kyseliny deoxycholové. Převzato z [28].

**Tab. 4** Vlastnosti a možnosti využití kyseliny deoxycholové [29 – 32].

Anglický název	Deoxycholic acid
Název dle IUPAC	(4R)-4-[(3R,5R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,12-dihydroxy-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoic acid
Sumární vzorec	$C_{24}H_{40}O_4$
Molekulová hmotnost	$392,6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Teplota tání	176 – 178 °C
Barva	Bílý prášek
Využití	Imunomodulátory, protizánětlivá látka, choleretikum, možnost využití v nanotechnologiích. Používá se také v potravinářství

### 1.3.3. Kyselina cholová

Strukturální vzorec kyseliny cholové (CA) je zobrazen na obr. 6. Vybrané charakteristické vlastnosti a možnosti využití jsou shrnuty v tab. 5.



**Obr. 6** Strukturální vzorec kyseliny cholové. Převzato z [33].

**Tab. 5** Vlastnosti a možnosti využití kyseliny cholové [34 – 37].

Anglický název	Cholic acid
Název dle IUPAC	(4R)-4-[(3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-3,7,12-trihydroxy-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]pentanoic acid
Sumární vzorec	$C_{24}H_{40}O_5$
Molekulová hmotnost	408,5714 g · mol <sup>-1</sup>
Teplota tání	198 °C
Barva	Bílý až světle béžový krystalický prášek
Využití	Terapie astmatu, léčba poruch syntézy žlučových kyselin, protizánětlivé účinky, antimikrobiální aktivita derivátů

## 1.4. Biosyntéza žlučových kyselin

Biosyntéza žlučových kyselin je jednou z hlavních cest odbourávání cholesterolu z organismu. Existují dvě odlišné metabolické cesty biosyntézy žlučových kyselin: klasická (neutrální) a alternativní (kyselé).

Klasická cesta syntézy primárních žlučových kyselin (CA, CDCA) probíhá v játrech, konkrétně na endoplazmatickém retikulu, v mitochondriích a peroxyzomech hepatocytů. Prvním krokem v jejich biosyntéze je  $7\alpha$ -hydroxylace cholesterolu za vzniku  $7\alpha$ -hydroxycholesterolu. Tato reakce je katalyzována mikrosomálním enzymem  $7\alpha$ -hydroxyláza, která vyžaduje přítomnost NADPH, cytochromu P-450 a kyslíku. Tato reakce reguluje rychlost syntézy žlučových kyselin. Další reakce zahrnují epimerizaci  $3\beta$ -OH skupiny na  $3\alpha$ -OH derivát, redukci dvojité vazby na steroidním kruhu B v pozici 5, zkrácení postranního řetězce o 3 atomy uhlíku a oxidaci posledního uhlíku na karboxylovou skupinu. Vzniká tak kyselina chenodeoxycholová (CDCA). Následnou hydroxylací v pozici 12 se za účasti enzymu  $12\alpha$ -hydroxylázy vytváří kyselina cholová (CA) [38, 39].

Alternativní syntéza žlučových kyselin může probíhat ve více tkáních. Počáteční enzym  $27\alpha$ -hydroxyláza je lokalizován v mitochondriích buněk. Cholesterol je proto přenesen do mitochondrií, kde dochází k jeho hydroxylaci za vzniku odlišného prekursoru než v klasické cestě syntézy žlučových kyselin. Následuje  $7\alpha$ -hydroxylace v přítomnosti oxysterol- $7\alpha$ -hydroxylázy. Další sled reakcí je identický s klasickou cestou. Alternativní cesta vede převážně k produkci CDCA [39].

Většina primárních kyselin se aktivuje po biosyntéze koenzymem A. Takto aktivované kyseliny jsou konjugovány s glycinem nebo taurinem, které svými  $\text{NH}_2$ -skupinami tvoří amidovou vazbu s karboxylem žlučových kyselin. V důsledku těchto konjugačních reakcí vznikají konjugované žlučové kyseliny: kyselina glykocholová a kyselina glykochenodeoxycholová, kyselina taurocholová a taurochenodeoxycholová (TCDCA). Poměr glycinových a taurinových konjugátů je obvykle u člověka 3:1.

Primární žlučové kyseliny a konjugované kyseliny po vyloučení z tenkého střeva podléhají dalším změnám v důsledku působení střevních bakterií. Jde o dekonjugace a  $7\alpha$ -dehydroxylace. Vznikají tak sekundární žlučové kyseliny, DCA z CA a LCA z CDCA [1, 38].

## 1.5. Funkce a využití žlučových kyselin

Hlavní funkcí žlučových kyselin je snížit povrchové napětí tuků a působit jako emulgační činidla, které umožňují trávení a vstřebávání tuků v tenkém střevě. Výrazně zvyšují celkový povrch tuků, a tím i celkovou plochu kontaktu tuku s enzymem, čímž je stimulována tuková lipolýza [39].

Žlučové kyseliny jsou amfipatické a jsou schopné tvořit micely. Uvnitř micel se hromadí látky hydrofobní povahy, jako je cholesterol, fosfolipidy, mastné kyseliny, monoacylglyceroly a vitamíny rozpustné v tucích. Micely hrají důležitou roli v trávení a přenášení tuků, a umožňují vstřebávání vitamínů rozpustných v tucích [40, 41].

Žlučové kyseliny jsou významné při odbourávání cholesterolu. Každý den se k syntéze žlučových kyselin používá 500 mg cholesterolu a přibližně stejné množství kyselin se vylučuje do stolice. Tento cyklus představuje hlavní způsob eliminace cholesterolu z těla a zajišťuje udržení jeho homeostázy [38].

Nedávné studie prokázaly, že kyseliny mohou působit také jako signální molekuly. Působí jako hormony, které váží a aktivují jaderné receptory (farnesoid–X–receptor a receptory vitamínu D) a receptory spojené s G–proteinem, čímž regulují expresi genů podílejících se na metabolismu lipidů, lipoproteinů a glukózy. Mohou se také zúčastnit na kontrole obezity a celkového výdaje energii [20, 42, 43].

Žlučové kyseliny se využívají ve farmakologii při nedostatečné tvorbě žlučových kyselin, onemocněních jater, rozpouštění žlučových kamenů. Pro své vlastnosti jsou zkoumány jako nosiče pro specifická jaterní léčiva nebo léčiva ke snížení hladiny cholesterolu, neopiátových analgetik, radiofarmak [13].

## 1.6. Metody stanovení žlučových kyselin

Pro stanovení žlučových kyselin se používají především chromatografické a enzymatické metody. Elektrochemické metody pro stanovení žlučových zatím nejsou dostatečně prozkoumány pro rutinní analýzy. Redukce žlučových kyselin na elektrodách na bázi rtuti byla zatím zkoumána jen okrajově [44, 45]. Možnosti uvedených metod jsou shrnuty v následujících podkapitolách.

### 1.6.1. Chromatografické metody

Metody chromatografie jsou vysoce citlivé analytické separační metody, které poskytují kvalitativní a kvantitativní informace o vzorku. Mezi nimi vyniká spojení GC a HPLC s hmotnostním spektrofotometrem. LC-MS je považována za referenční metodu pro měření žlučových kyselin v séru nebo plazmě. Její zavedení do klinické praxe je však značně omezeno mnoha aspekty, jako jsou dlouhá preanalytická fáze, vysoké náklady na přístrojové vybavení, potřeba kvalifikovaných pracovníků a dlouhá doba měření. Používá se oktadecylová (C<sub>18</sub>) stacionární fáze. K eluci dochází v pořadí: taurinové konjugáty < glycinové konjugáty < nekonjugované žlučové kyseliny [46, 47].

Pro přímou a nedestruktivní analýzu žlučových kyselin a jejich konjugátů s glycinem a taurinem se používá reverzní HPLC. Jako detekční techniky se využívá UV detekce, fluorescenční spektrometrie, elektrochemická a refraktometrická detekce. Tato metoda vyžaduje předkolonovou derivatizaci, například navázání molekuly chromoforu na C<sub>24</sub> karboxylovou skupinu nekonjugovaných žlučových kyselin nebo převedení kyseliny cholové na její N-nitrosoderivát [47 – 49].

Další metodou stanovení žlučových kyselin je kapilární elektrochromatografie. Žlučové kyseliny s 4-nitro-7-piperazino-1,2,3-benzoxadiazolem tvoří amidy a mohou být detekovány fluorescenční spektrometrií. Touto metodou byly stanoveny kyseliny: cholová, deoxycholová, ursodeoxycholová a lithocholová [50].

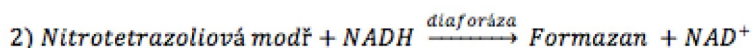
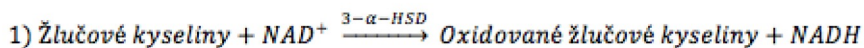
### 1.6.2. Enzymatické metody

Enzymatické metody jsou nejrozšířenější metody pro stanovení žlučových kyselin v klinických laboratořích. Stanovení se provádí na automatických biochemických analyzátoch, což umožňuje jejich rutinní používání. Po enzymatické reakci se fotometricky měří nárůst nebo úbytek analytu.

Nedávný vývoj komerčních enzymatických testů pro stanovení celkových žlučových kyselin v séru nebo plazmě přispěl k jejich zavedení do rutinní klinické laboratorní praxe. Nejčastěji se používá metoda s nitrotetrazoliovou modří a cyklická enzymatická metoda.

Metoda s nitrotetrazoliovou modří (NBT) je enzymatický kolorimetrický test pro kvantitativní stanovení celkových žlučových kyselin v séru nebo plazmě. Jak ukazuje následující reakční schéma, enzym 3- $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenáza (3- $\alpha$ -HSD)

v přítomnosti  $\text{NAD}^+$  přeměňuje žlučové kyseliny na 3-ketosteroidy a  $\text{NADH}$ . NBT je redukována  $\text{NADH}$  za vzniku barevného formazanu. Reakce je katalyzována enzymem diaforázou. Intenzita barviva se měří při 540 nm a je přímo úměrná koncentraci žlučových kyselin ve vzorku [51].



## Schema

1: Reakční schéma enzymatické kolorimetrické metody s nitrotetrazoliovou modří (NBT) pro kvantitativní stanovení celkových žlučových kyselin v séru nebo plazmě

### 1.6.3. Elektrochemické metody i senzory

Vzhledem k tomu, že chromatografické metody v kombinaci s vhodnou detekční technikou jsou náročné na aparaturu či finančně, je snahou zavést méně nákladnou a náročnou elektroanalytickou metodu. Existuje poměrně málo výzkumů o elektrochemické aktivitě žlučových kyselin. Dosud známé poznatky týkající se elektrochemie žlučových kyselin jsou shrnuty v přehledných člancích [11, 52].

Možnosti elektrochemické detekce na nemodifikovaných elektrodách byly nedávno rozšířeny o oxidace žlučových kyselin obsahujících  $7\alpha$  hydroxylovou skupinu (např. kyselina cholová a chenodeoxycholová) v prostředí acetonitril:kyselina chloristá, kdy probíhá jejich dehydratace, tj. zavedení jedné či více dvojných vazeb do molekuly. Vzniklé produkty se oxidují v rozsahu potenciálového okna borem dopované diamantové a platinové elektrody nebo elektrody ze skelného uhlíku [53, 54]

Ferii *et al.* využil ke stanovení žlučových kyselin diferenční pulzní polarografie. Byly zkoumány kyseliny: cholová, deoxycholová, taurodeoxycholová, glykodeoxycholová, chenodeoxycholová, ursodeoxycholová a lithocholová. Pík měřených kyselin se nachází v rozmezí  $-1,15$  V až  $-1,35$  V. Všechny žlučové kyseliny byly stanovitelné při  $\text{pH} \geq 4,0$ ; kromě LCA, která je aktivní pouze při vyšším pH ( $\text{pH} \geq 10,0$ ) [45].

Yilmaz *et al.* studoval elektrochemické chování kyseliny cholové voltametričnými metodami: *square-wave stripping* voltmetrie a cyklická voltmetrie v prostředí BR pufru při pH 9,0. Pík se objevil kolem  $-1,45$  V a nevykazoval proporcionalní přírůstek se standardním přídatkem [55].

Liu *et al.* využil ke studiu elektrochemické redukce kyseliny deoxycholové cyklickou voltametrií. Měření probíhala ve fosfátovém pufru při pH 6,3. Katodický pík se nachází kolem +0,65 V [56].

Studium elektrochemického chování žlučových kyselin bylo provedeno metodou diferenční pulzní a cyklické voltametrie na rtuťové visící kapkové elektrodě, na leštěné stříbrné tuhé amalgamové elektrodě a na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgamové elektrodě na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v rámci systematického studia v UNESCO laboratoři elektrochemie životního prostředí. Konkrétně byly studovány kyseliny: cholová, deoxycholová, dehydrocholová, tauroursodeoxycholová, glykocholová, chenodeoxycholová, ursodeoxycholová a lithocholová. Bylo zjištěno, že žlučové kyseliny poskytují katodické signály, jejichž poloha a intenzita se liší v závislosti na jejich struktuře a pH prostředí, ve kterém měření probíhá [57 – 61].

Pro analýzu žlučových kyselin jako léčiv byla zkoumána možnost stanovení na cholátové iontově selektivní elektrodě s tekutou membránou využívající benzyldimethylcetylamonium cholát jako senzor [62].

## 1.7. Visící rtuťová kapková elektroda

Visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) je tvořena kapkou rtuti na konci kapiláry, na které probíhá měření. Kapka je obnovitelnou – před další analýzou se kapka mechanicky odklepne a vytvoří se nová [63].

V elektroanalytické chemii je HMDE oblíbená pro své vlastnosti: možnost vyšší rychlosti polarizace pro voltametrický scan oproti klasické kapající rtuťové elektrodě, velké vodíkové přepětí, a snadná a rychlá obměna elektrodového povrchu vytvořením nové kapky. Její velká nevýhoda spočívá v tom, že HMDE je mechanicky nestabilní a při její použití jsou vyšší problémy s pasivací elektrody během měření vzhledem k neobnovovanému povrchu elektrody. Vyskytují se také do značné míry neopodstatněné obavy ohledně toxicity rtuti, kvůli kterým je zakázané její používání v některých zemích [63 – 66].

Rozsah potenciálů, při kterých je HMDE použitelná, je ve vodných prostředích podle pH a složení roztoku od +0,4 V až do -2,6 V. Při potenciálech kladnějších než



+0,4 V dochází k anodickému rozpouštění rtuti, při zápornějších než  $-2,6$  V pak k rozkladu vody [63]. Na rtuťových elektrodách lze stanovit elektroaktivní látky na základě jejich elektrochemické redukce, látky reagující s ionty rtuti, případně na rtuti adsorbovatelné [64].

## 1.8. Elektrochemické metody a adsorpce organických látek na povrch elektrody

Pro studium redoxního a adsorpčního chování organických látek se využívá AC voltametrie a měření závislosti diferenciální kapacity  $C_d$  na vloženém potenciálu  $E$ .

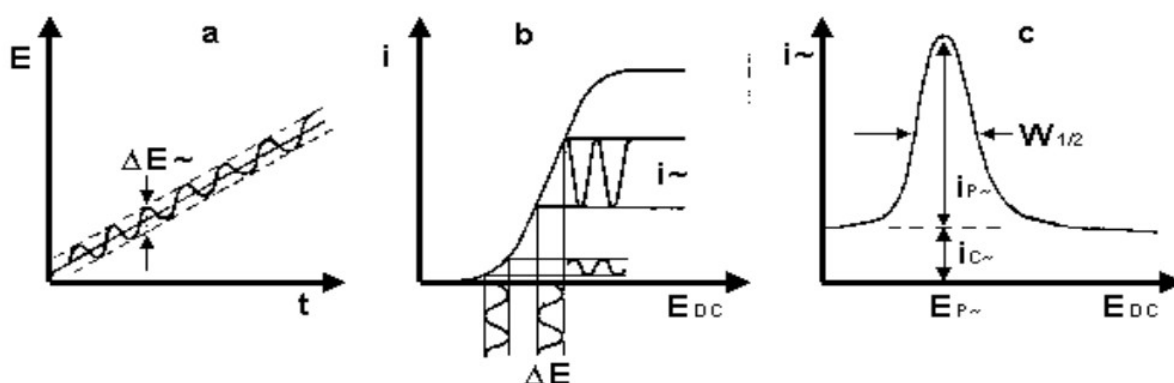
Při vyhodnocování AC voltamogramů je základem porovnání křivky pro samotný základní elektrolyt a elektrolyt v přítomnosti studované látky. Platí, že pokud jsou hodnoty proudu v přítomnosti studované látky nižší než pro elektrolyt, tj. křivka studované látky je pod křivkou elektrolytu dochází k její adsorpci na povrch elektrody.

Na AC voltamogramech můžeme sledovat také píky – ty mohou být buď původu faradaického nebo kapacitního. V případě kapacitních píku se jedná většinou o píky tenzametrické, tedy píky, které mají svůj původ v reorientaci molekul. Při té dochází k přeskupení adsorbovaných molekul, popřípadě jejich desorpci z povrchu. Kapacitní píky lze je identifikovat i zpětným skenem, kdy by měly být nepatrné, pokud v oblasti, odkud skenujeme, nedochází k adsorpci.

Samotná adsorbce molekul má mnoho podob. V případě žlučových kyselin lze předpokládat, že se jedná o 2D kondenzaci, kdy dochází u adsorbovaných molekul k specifickému samouspořádání – vzniku SAM (*self assembled monolayers*). V případě 2D kondenzace se uvažuje o tom, že planární molekuly jsou na povrch elektrod adsorbovány na plocho. Při další adsorpci může docházet ke vzniku 2D vrstev. Usuzuje se na jejich vztyčení a tím pádem vzniku kompaktnější vrstvy, což má za následek odtlačení více molekul elektrolytu a další snížení kapacity. Pro 2D vrstvy jsou tak charakteristické výrazné kapacitní jámy, které jsou identifikovatelné přesně ohraničenou oblastí poklesu  $C_d$  s ostrými náběžnými hranami a plochým dnem kapacitní jámy (oblast s konstantní velikostí  $C_d$ ). Dále je pro 2D kondenzace typické zužování jámy a zvyšování jejího dna při zvýšení teploty a/nebo snížením koncentrace kondenzující látky [67 – 71].

### 1.8.1. AC voltametrie

AC (*alternating current*) voltametrie je faradaická impedanční technika, při které potenciál vkládaný na elektrodu se mění lineárně s časem a je modulovaný střídavým napětím sinusového průběhu o malé amplitudě ( $\approx 10\text{mV}$ ) a nízké frekvenci (desítky až stovky Hz). Měří se závislost střídavého proudu procházejícího elektrodou na jejím potenciálu. Signálem získaným z AC polarografického měření je reálná a imaginární složka admitance  $Y$ . AC voltametrií se studují hlavně kapacitní děje, čehož se využívá pro studium adsorpce povrchově aktivních látek [63, 72].



**Obr. 7** Princip AC voltametrie. a) časový průběh vkládaného napětí b) vznik střídavé složky proudu vyvolaného střídavou složkou napětí c) ideální AC voltamogram. Převzato z [72].

### 1.8.2. Měření závislosti diferenciální kapacity $C_d$ na vloženém potenciálu $E$

Elektrodová dvojvrstvá je prostor roztoku v bezprostřední blízkosti povrchu elektrody. Organizace této dvojvrstvy určuje elektrickou kapacitu. Změny její struktury se projevují v hodnotě diferenciální kapacity ( $C_d$ ). Tento princip se používá pro studium adsorpčních jevů na površích elektrod. Nejvhodnější elektrodou pro měření závislosti diferenciální kapacity na vloženém potenciálu je HMDE kvůli jejímu snadno obnovitelnému a hlavně ideálně rovinnému povrchu. Měření  $C_d - E$  závislosti na HMDE je základem pro studium struktury elektrodové dvojvrstvy a adsorpce na povrchu elektrody. Stanovení  $C_d$  je založeno na měření admitance, která je vyhodnocena na základě Ohmova zákona měřením střídavého proudu [72 – 74].

## 2. Experimentální část

### 2.1. Studované látky

Standardy kyseliny lithocholové, kyseliny deoxycholové a kyseliny cholové byly od firmy Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Minimální deklarovaná čistota byla 98%.

### 2.2. Použité chemikálie

Ostatní použité chemikálie byly (pokud není udáno jinak) analytické čistoty: methanol (Merck, Drážďany, Německo;  $\geq 99,9\%$  a Penta, Chrudim, ČR;  $\geq 99,8\%$ ); hydroxid sodný (Penta, ČR; p.a.); kyselina fosforečná (Lachema, Brno, ČR; p.a.); kyselina octová (Lachema, ČR; 98%); kyselina boritá (Penta, ČR; p.a.); chlorid sodný (Lach-Ner, ČR, 99,5%); bromid sodný (Lach-Ner, ČR, 99%); jodid sodný (Lach-Ner, ČR, 99,5%).

### 2.3. Příprava roztoků

#### 2.3.1. Zásobní roztoky žlučových kyselin

Zásobní roztoky studovaných žlučových kyselin o koncentraci  $c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$  byly připraveny navážením  $m = 0,09425 \text{ g}$  kyseliny lithocholové,  $m = 0,09825 \text{ g}$  deoxycholové kyseliny a  $m = 0,10225 \text{ g}$  kyseliny cholové. Navážky byly následně kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněny po rysku methanolem (99,9%, Merck, Germany).

#### 2.3.2. Pufry

K přípravě kyselé složky BR pufry byly použity kyseliny: 99,8% kyselina octová (Lachema, Brno, ČR), 85% kyselina fosforečná (Lachema, Brno, ČR) a kyselina boritá (čistota p.a., Penta, Chrudim, ČR). Všechny kyseliny byly o koncentraci  $c = 0,04 \text{ mol l}^{-1}$ . K přípravě zásadité složky byl použit  $c = 0,2 \text{ mol l}^{-1}$  hydroxid sodný (čistota p.a., Lachema, Brno, ČR).

## 2.4. Metody měření a přístroje

### 2.4.1. Voltametrická měření

Voltametrická měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení v systému Metrohm VA stand 663. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (plocha kapky 0,4 mm<sup>2</sup>). Jako referenční elektroda byla použita argentchloridová elektroda s chloridem draselným o koncentraci 3,0 mol l<sup>-1</sup>. Pomocnou elektrodou byla platinová drátková elektroda.

Pro většinu voltametrických měření byl použit Autolab PGSTAT 302, ovládaný osobním počítačem za využití softwaru Nova 2.1.4 (Metrohm Autolab B.V., Nizozemsko). Software pracoval v operačním systému Microsoft Windows XP. Pro měření závislosti kapacity na teplotě byl použit PalmSens4 (Palm Instruments, Nizozemsko) a výrobcem dodaný software PSTrace 5.

Není-li uvedeno jinak, měřené roztoky byly připravovány do 10ml odměrných baněk. Jako základní elektrolyt byl použit pufr (ve většině případů BR pufr) a methanol v poměru 9:1. Měřená koncentrace žlučových kyselin byla  $5 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>. Měřené roztoky byly před začátkem měření asi dvě minuty probublávány dusíkem (argonem v případě měření teplotní závislosti diferenciální kapacity na potenciálu), aby došlo k odstranění kyslíku z roztoku. Po dobu měření byl dusík přiváděn nad roztok.

Elektrochemické a adsorpční chování žlučových kyselin bylo studováno metodami cyklické voltametrie (CV), ACV a měřením závislosti diferenciální kapacity  $C_d$  na vloženém potenciálu  $E$ . Měření probíhalo v potenciálovém rozmezí 0 V až -1,7 V.

V ACV byly použity následující parametry: modulační amplituda 25 mA; modulační čas 0,2 s; frekvence 37 Hz; rychlost scanu 8 mV s<sup>-1</sup>.

Při měření  $C_d - E$  závislosti byly použity následující parametry: perturbační frekvence ac složky 243 Hz; amplituda ac složky 5 mV (rms); rychlost scanu 8 mV s<sup>-1</sup>.

Každé měření bylo prováděno minimálně třikrát, vždy na nové rtuťové visící kapce. Pro prezentaci byly zvoleny záznam druhé křivky.

## **2.5. Vyhodnocení výsledků**

Ke zpracování naměřených dat byly použity následující počítačové programy: OriginPro8 (OriginLab Corporation, USA), Excel2007 (Microsoft, USA) a Word2007 (Microsoft, USA).

### 3. Výsledky a diskuze

Bylo studováno elektrochemické a adsorpční chování tří žlučových kyselin, které se od sebe liší počtem hydroxylových skupin: LCA – jedna hydroxylová skupina, DCA – dvě hydroxylové skupiny, CA – tři hydroxylové skupiny. Studium bylo prováděno metodami CV, ACV a měřením závislosti diferenciální kapacity  $C_d$  na vloženém potenciálu  $E$  na HMDE.

O adsorpčním chování žlučových kyselin dosud nebyly publikovány žádné práce, kromě předběžných studií metodou cyklické voltametrie a diferenční pulzní voltametrie v rámci systematického studia v UNESCO laboratoři elektrochemie životního prostředí na Přírodovědecké fakultě UK publikovaných v diplomových pracích [57 – 61]. Na druhé straně byla podrobně studována adsorpce a 2D kondenzace dusíkatých bází nukleových kyselin a jejich halogenovaných a methylovaných derivátů. [68 – 71].

#### 3.1. Vliv pH prostředí na chování lithocholové kyseliny

##### 3.1.1. Cyklická voltametrie

Chování kyseliny lithocholové (o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v závislosti na různých hodnotách pH bylo studováno metodou CV na HMDE v prostředí BR pufr: methanol v poměru 9:1. Hodnoty pH BR pufru byly v rozsahu od pH 2,0 do pH 12,0.

V tabulce 6 jsou zaznamenány rozpustnosti studovaných žlučových kyselin. Jejich  $pK_a$  jsou v rozmezí 4,8 až 6,2. Při hodnotách pH vyšších, než je hodnota  $pK_a$  dochází k disociaci karboxylové skupiny žlučových kyselin za tvorby aniontu. Proto se žlučové kyseliny snadněji rozpouštějí v bazických pH. LCA má nejnižší hodnotu  $pK_a$  ze studovaných kyselin (pak 4,8, viz tab. 2) a pouze jednu hydroxylovou skupinu. Pro koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  je rozpustná až pro pH 9,0 a vyšší hodnoty.

Naměřené cyklické voltamogramy LCA jsou znázorněny na obr. 8. Pro přehlednost nejsou na obrázku znázorněna všechna naměřená data, ale jen křivky pro pH: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 9,0; 11,0. Z obrázku je patrné, že se při  $\text{pH} \geq 7,0$  tvoří tři katodické píky a tři anodické protipíky: první je v rozmezí potenciálu  $-0,2 \text{ V}$  až  $-0,4 \text{ V}$ , druhý je kolem  $-0,9 \text{ V}$  až  $-1,1 \text{ V}$  a třetí je kolem  $-1,2 \text{ V}$  až  $-1,4 \text{ V}$ . Při pH 6,0 pozorujeme jen třetí pik, který je posunut do kladnějších hodnot potenciálu, u nižších pH nepozorujeme žádné další píky. Příčinou takové změny chování LCA je zřejmě protonizace karboxylového aniontu. Chování LCA je zásadně jiné než pro DCA a CA

(viz níže), jelikož v případě LCA je na voltamogramech pozorovatelných více signálů, obzvláště v zásaditých prostředích, na rozdíl od obou dalších kyselin, které vykazují pouze jeden katodický signál při potenciálu kolem  $-1,2$  V až  $-1,4$  V.

Chování DCA a CA bylo již studováno v předběžných studiích [57, 60]. Na HMDE poskytovala DCA v rozmezí pH 3,0 – 12,0 jeden katodický pík v oblasti vysoce záporných potenciálů, ca  $-1,2$  V až  $-1,3$  V (vs. Ag/AgCl). Při pH BR pufru 6,0 – 12,0 je tento doprovázen dalším, záporněji položeným a ostrým katodickým píkem. Vzhledem k blízké hodnotě potenciálu obou katodických píků  $\Delta E_p$  ca 50 mV – 100 mV lze katodický signál popsat jako dvojpík („post-peak“). Výška píků je výrazně závislá na pH základního elektrolytu. Nižší píky se vyskytují v zásaditých a neutrálních prostředích, výrazný nárůst proudu píku, případně jejich posun do oblasti zápornějších potenciálů nastává v rozmezí pH 5,0 – 4,0. Důvodem změny chování DCA je pravděpodobně protonizace karboxylové skupiny při těchto pH, blízkých jejich hodnotě pKa (pKa = 6,2). Metodou cyklické voltametrie v prostředí BR pufr – methanol (9:1) o pH 12,0 bylo zjištěno, že kyselina poskytuje katodický dvojpík/anodický pík. Hodnota  $\Delta E_p$  dosahuje hodnot od 25 do 133 mV v závislosti na rychlosti polarizace. Příslušný elektroodový děj lze klasifikovat jako quasireverzibilní. Oba elektroodové děje jsou řízeny adsorpcí. [60]. Na m-AgSAE poskytuje DCA pouze jeden katodický pík v rozsahu potenciálu  $-1,4$  V až  $-1,6$  V, případně dvojpík pro vyšší rychlosti polarizace od  $320$  mV s<sup>-1</sup> v prostředí v prostředí BR pufr – methanol (9:1) o pH 4,0. Pro DCA a metodu cyklické voltametrie v tomto prostředí byl zaznamenán anodický protipík, kdy do rychlosti  $40$  mV s<sup>-1</sup> směřoval vrchol píku do katodické oblasti a od rychlosti polarizace  $80$  mV s<sup>-1</sup> do anodické oblasti [57]. Podobné chování bylo popsáno na m-AgSAE pro kyselinu chenodeoxycholovou v témže prostředí [61].

Uvedené jevy – vznik katodického dvojpíku, anodický pík obrácený do katodické oblasti – byly popsány pro elektrochemické reakce probíhající v adsorbovaném stavu. Konkrétně, ke vzniku dvojpíku díky následnému píku („post-peak“) může docházet v případě, že je produkt elektroodové reakce silně adsorbován na povrch elektrody [75].

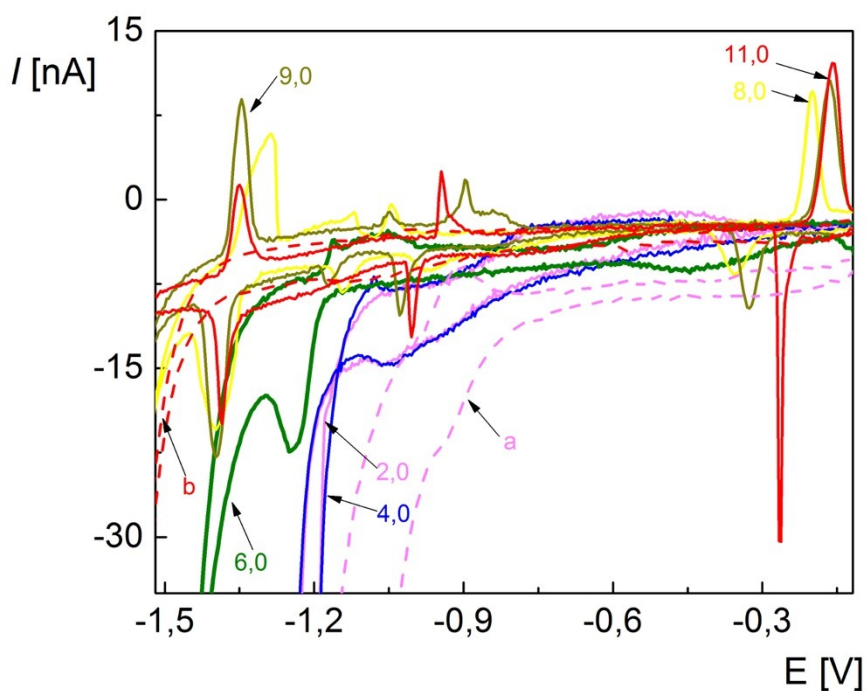
CA byla studována pouze na m-AgSAE, kdy byl prokázán jeden katodický pík v oblasti vysoce záporných potenciálů, ca  $-1,2$  V až  $-1,3$  V (vs. Ag/AgCl), bez přítomnosti dvojpíku nebo anodický pík obrácený do katodické oblasti za stejných

podmínek jako pro DCA [57]. Lze předpokládat, že popsaný katodický pík přísluší redukci protonu, která je katalyzována žlučovou kyselinou v adsorbovaném stavu na povrchu elektrodě. V případě DCA je tato adsorpce silnější a projevuje se vznikem dvojpíku či obratem píku při zpětném anodickém skanu do katodické oblasti v cyklické voltametii.

**Tab. 6** Rozpustnosti kyseliny lithocholové (LCA), deoxycholové (DCA) a cholové (CA) o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  v prostředí BR pufr:metanol v poměru 9:1 pro pH pufru 2,0 až 12,0. ANO – kyselina byla rozpuštěná. NE – kyselina nebyla rozpuštěná.

pH BR pufru	LCA pKa = 4,8	DCA [57] pKa = 6,2	CA [57] pKa = 5,2
2,0	NE	NE	ANO
3,0	NE	NE	ANO
4,0	NE	NE	ANO
5,0	NE	NE	ANO
6,0	NE	ANO	ANO
7,0	NE	ANO	ANO
8,0	NE	ANO	ANO
9,0	ANO	ANO	ANO
10,0	ANO	ANO	ANO
11,0	ANO	ANO	ANO
12,0	ANO	ANO	ANO





**Obr. 8** Cyklické voltamogramy LCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) měřené na HMDE v prostředí BR pufr:methanol (9:1). Čísla v grafu odpovídají hodnotě pH BR pufru. Základní elektrolyt (přerušovaně): a) pH 2,0; b) pH 11,0. Rychlost polarizace  $40 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 3.1.2. AC voltametrie

Studium chování kyseliny lithocholové (o koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v závislosti na různých hodnotách pH metodou ACV na HMDE bylo prováděno v prostředí BR pufr: methanol v poměru 9:1. Hodnoty pH BR pufru byly v rozsahu od pH 2,0 do pH 12,0.

Naměřené AC voltamogramy LCA jsou znázorněny na obr. 9, obr. A a B je pro katodický scan od 0 V do  $-1,7 \text{ V}$ ; obr. C a D pro zpětný anodický scan.

Na voltamogramech pro katodický scan jsou evidentní rozdíly v závislosti na pH. Na křivkách se nacházejí maximálně dvě oblasti, ve kterých se vyskytují píky: první je kolem  $-0,2 \text{ V}$  a druhá je kolem  $-1,2 \text{ V}$  až  $-1,4 \text{ V}$ . První pík tvoří pozitivnější hranu kapacitní jámy a je přítomen pouze v roztocích o pH 10,0 – 12,0. Při pH 9,0 – 7,0 se posouvá k zápornějším hodnotám potenciálu *ca*  $-0,3 \text{ V}$  a výrazně se snižuje jeho výška. V roztocích o pH 10,0 – 12,0 je také zřejmá výrazná negativnější hranu kapacitní jámy při potenciálu *ca*  $-0,9 \text{ V}$  až  $-1,0 \text{ V}$ . Pro nižší pH (9,0 – 6,0) se výška jámy snižuje

a hrana se posouvá k negativnějším potenciálům  $-1,1$  V až  $-1,2$  V. Druhý pík je zřejmě faradaického původu. Pro pH 2,0 – 4,0 se nachází pozitivněji, u *ca*  $-1,2$  V, pro pH 7,0 – 12,0 se pak posouvá k potenciálu *ca*  $-1,4$  V. Příčinou takové změny chování LCA je zřejmě protonizace karboxylového aniontu, ke které dochází v oblasti pH odpovídajícímu pKa (4,8 pro LCA). Při pH 5,0 a 6,0 se neobjevil faradaický, při pH 5,0 ani kapacitní pík.

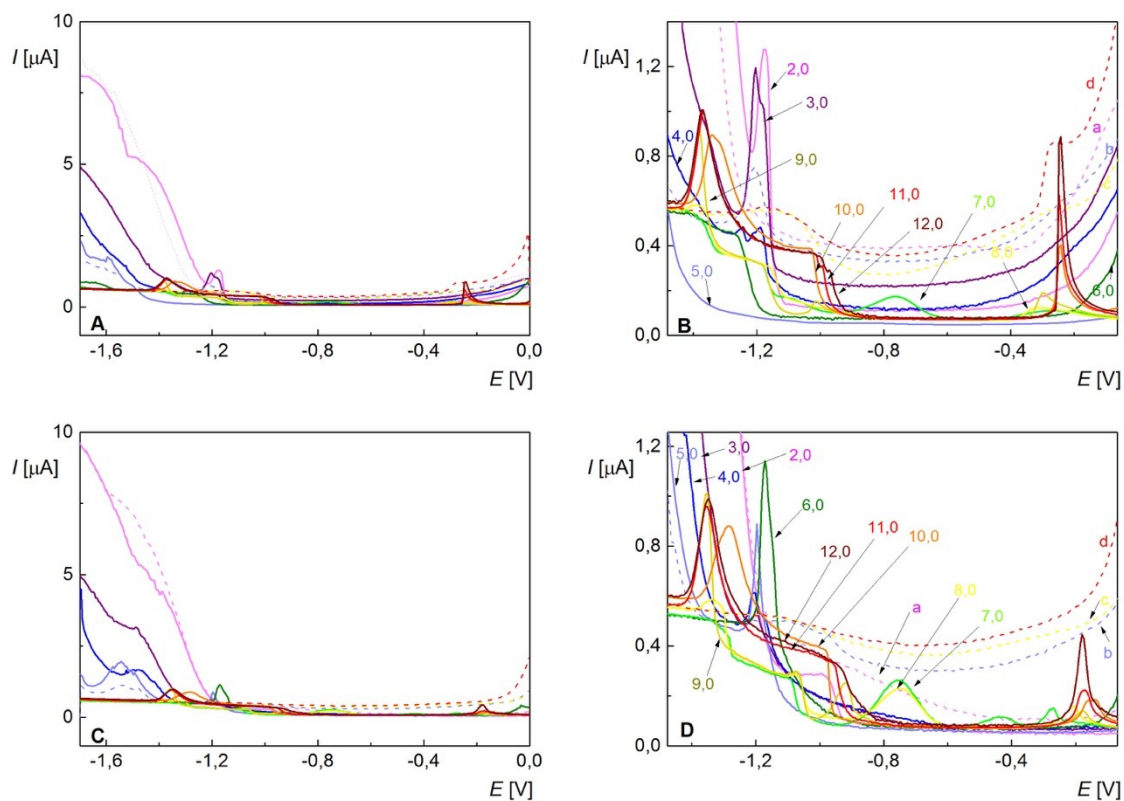
Lze tedy konstatovat, že výrazná kapacitní jáma je zřetelná pouze pro pH 12,0 – 10,0, kdy je LCA disociovaná a dobře rozpuštěná v roztoku. Vzhledem k předpokládané hodnotě potenciálu nulového náboje ( $E_{pzc}$ ) kolem  $-0,45$  V [70] dochází k 2D kondenzaci záporně nabitých molekul v oblasti kolem  $-0,2$  V, kdy je elektroda kladně nabitá, na základě elektrostatické interakce, a reorientaci molekul v oblasti negativnější hrany kapacitní jámy v důsledku rostoucího záporného náboje na elektrodě. Pozorovaný faradaický děj je zřejmě redukce protonu karboxylové skupiny, jak bylo popsáno v [45].

Průběh zpětného anodického scanu je obdobný v oblasti prvního kapacitního píku u  $-0,2$  V, tj dochází ke změnám kapacity v důsledku 2D kondenzace molekul v prostředích o pH 12,0 – 7,0. Změny oproti anodickému scanu jsou viditelné v oblasti faradaického píku kolem  $-1,1$  V až  $-1,2$  V pro kyselé roztoky, kdy pro pH 5,0 a 6,0 je tento patrný a naopak není výrazný nebo přítomen pro pH 2,0 a 3,0, kdy není LCA disociovaná. Kinetika pozorovaného děje je zřejmě příliš pomalá a signál tak není zřejmě vidět vzhledem k potenciálu blízkému úniku základního elektrolytu.

Píky kolem  $-0,2$  V a  $-1,2$  V až  $-1,4$  V jsou srovnatelné s píky na cyklickém voltamogramu (obr. 8). Při obou měřeních byla pozorována identická změna chování LCA v závislosti na pH.

Pouze při pH 10,0 až 12,0 jsou vidět 2D – jámy, to znamená že při hodnotách pH v rozmezí 2,0 až 9,0 nejde o 2D – kondenzaci, ale o jiný druh adsorpce.

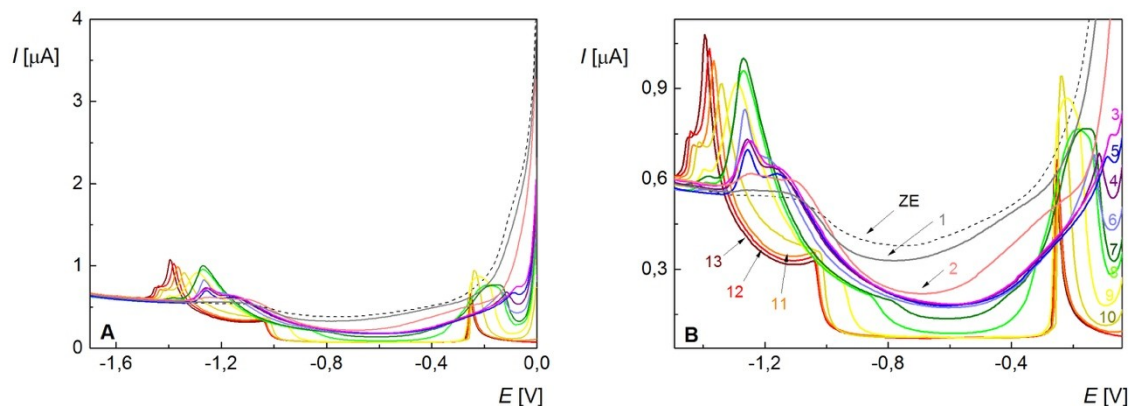
S ohledem na výše uvedené, pro další měření byla zvolena hodnota pH 11,0.



**Obr. 9** AC voltamogramy LCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) měřené na HMDE v prostředí BR pufr:methanol (9:1). Čísla v grafu odpovídají hodnotě pH BR pufru. Základní elektrolyt (přerušovaně): a) pH 2,0; b) pH 5,0; c) pH 8,0; d) pH 11,0. A, B (B je výřez z A) – scan ve směru od 0 V do -1,7 V; C, D (D je výřez z C) – zpětný scan ve směru od -1,7 V do 0 V.

### 3.2. Koncentrační závislost

Koncentrační závislost LCA byla změřena metodou AC voltametrie v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol v poměru 9:1 na HMDE v rozsahu koncentrací LCA  $1 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . Voltamogramy LCA jsou zobrazeny na obr. 10.

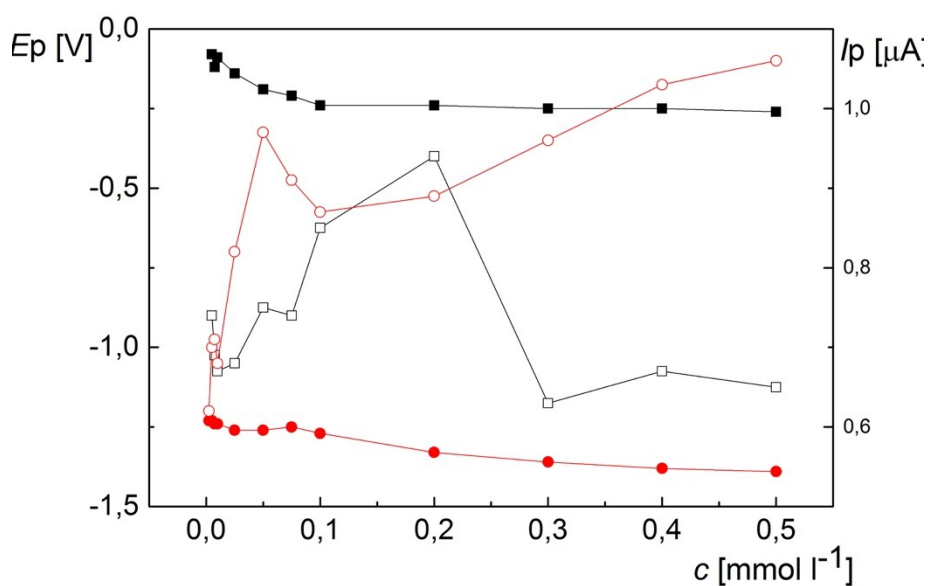


**Obr. 10** AC voltamogramy LCA na HMDE v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol (9:1). Koncentrace LCA ( $\text{mol l}^{-1}$ ): (ZE) základní elektrolyt; 1)  $1 \cdot 10^{-6}$ ; 2)  $2,5 \cdot 10^{-6}$ ; 3)  $5 \cdot 10^{-6}$ ; 4)  $7,5 \cdot 10^{-6}$ ; 5)  $1 \cdot 10^{-5}$ ; 6)  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ; 7)  $5 \cdot 10^{-5}$ ; 8)  $7,5 \cdot 10^{-5}$ ; 9)  $1 \cdot 10^{-4}$ ; 10)  $2 \cdot 10^{-4}$ ; 11)  $3 \cdot 10^{-4}$ ; 12)  $4 \cdot 10^{-4}$ ; 13)  $5 \cdot 10^{-4}$ . B je výřez z A.

LCA poskytuje 2 píky: kapacitní pík kolem  $-0,2 \text{ V}$  a faradaický pík kolem  $-1,2 \text{ V}$  až  $-1,4 \text{ V}$ . V tab. 7 jsou uvedeny hodnoty potenciálu ( $E_{p_1}$ ,  $E_{p_2}$ ) a proudu ( $I_{p_1}$ ,  $I_{p_2}$ ) píků v závislosti na koncentraci LCA. Tato závislost je graficky zobrazena na obr. 11. Potenciály obou píků se s rostoucí koncentrací posouvají k zápornějším potenciálům, pohybují se v rozmezí  $-0,08 \text{ V}$  až  $-0,26 \text{ V}$  pro kapacitní pík a  $-1,23 \text{ V}$  až  $-1,39 \text{ V}$  pro faradaický pík. Proud faradaického píku ( $I_{p_2}$ ) roste se stoupající koncentrací LCA. Hodnoty proudu při koncentraci LCA  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  a  $7,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  jsou odlehlé. Ze závislosti proudu kapacitního píku ( $I_{p_1}$ ) na koncentraci LCA je zřejmé, že hodnoty proudu nejsou přímo úměrné koncentraci. Takové skoky v proudech mohou být způsobeny různým uspořádáním adsorbovaných molekul při různých koncentracích.

**Tab. 7** Hodnoty potenciálu ( $E_{p_1}$ ,  $E_{p_2}$ ) a proudu ( $I_{p_1}$ ,  $I_{p_2}$ ) píků v závislosti na koncentraci LCA, naměřené pomocí ACV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol (9:1).

Koncentrace LCA [mol l <sup>-1</sup> ]	$E_{p_1}$ [V]	$I_{p_1}$ [μA]	$E_{p_2}$ [V]	$I_{p_2}$ [μA]
$1 \cdot 10^{-6}$	–	–	–	–
$2,5 \cdot 10^{-6}$	–	–	-1,23	0,62
$5 \cdot 10^{-6}$	-0,08	0,74	-1,23	0,7
$7,5 \cdot 10^{-6}$	-0,12	0,69	-1,24	0,71
$1 \cdot 10^{-5}$	-0,09	0,67	-1,24	0,68
$2,5 \cdot 10^{-5}$	-0,14	0,68	-1,26	0,82
$5 \cdot 10^{-5}$	-0,19	0,75	-1,26	0,97
$7,5 \cdot 10^{-5}$	-0,21	0,74	-1,25	0,91
$1 \cdot 10^{-4}$	-0,24	0,85	-1,27	0,87
$2 \cdot 10^{-4}$	-0,24	0,94	-1,33	0,89
$3 \cdot 10^{-4}$	-0,25	0,57	-1,36	0,96
$4 \cdot 10^{-4}$	-0,25	0,67	-1,38	1,03
$5 \cdot 10^{-4}$	-0,26	0,65	-1,39	1,06

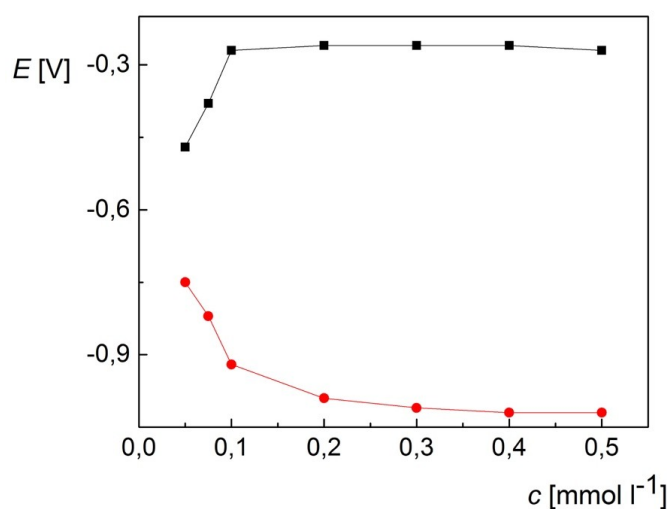


**Obr. 11** Závislost potenciálu (■)  $E_{p_1}$  (●)  $E_{p_2}$  a proudu (□)  $I_{p_1}$  (○)  $I_{p_2}$  píků na koncentraci LCA v rozsahu  $2,5 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>, naměřená pomocí ACV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol (9:1).

Jak již bylo zmíněno, 2D kondenzace žlučových kyselin je zřejmá na AC voltamogramech díky tvorbě typických kapacitních jam. Ty vznikají při koncentraci LCA v rozsahu  $5 \cdot 10^{-5}$  až  $5 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>. Hodnoty potenciálu ( $E_1$ ,  $E_2$ ) hran kapacitní jámy a rozdílu proudu základního elektrolytu a dna jámy v přítomnosti LCA ( $\Delta I$ ) v závislosti na koncentraci LCA jsou uvedeny v tab. 8. Kapacitní jáma se rozšiřuje s rostoucí koncentrací, což je pro 2D kondenzace typické [70]. Hodnoty proudu se ustalují při koncentraci LCA  $2 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup> (obr. 12).

**Tab. 8** Hodnoty potenciálu ( $E_1$ ,  $E_2$ ) hran kapacitní jámy a rozdílu proudu základního elektrolytu a dna jámy v přítomnosti LCA ( $\Delta I$ ) v závislosti na koncentraci LCA, naměřené pomocí ACV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol (9:1).

Koncentrace LCA [mol l <sup>-1</sup> ]	$E_1$ [V]	$E_2$ [V]	$\Delta I$ [μA]
$5 \cdot 10^{-5}$	-0,47	-0,75	0,24
$7,5 \cdot 10^{-5}$	-0,38	-0,82	0,29
$1 \cdot 10^{-4}$	-0,27	-0,92	0,31
$2 \cdot 10^{-4}$	-0,26	-0,99	0,31
$3 \cdot 10^{-4}$	-0,26	-1,01	0,31
$4 \cdot 10^{-4}$	-0,26	-1,02	0,31
$5 \cdot 10^{-4}$	-0,27	-1,02	0,31



**Obr. 12** Závislost potenciálů hran kapacitní jámy ((■)  $E_1$ , (●)  $E_2$ ) na koncentraci LCA, naměřené pomocí ACV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol (9:1).

### 3.3. Transferové techniky pro ověření adsorpce

Pro důkaz adsorpce žlučových kyselin byly použity transferové techniky [67]. Měření probíhalo následujícím způsobem: na začátku se žlučové kyseliny adsorbovaly na povrchu elektrody během 5 až 60 vteřin, následně byla elektroda přemístěna do roztoku základního elektrolytu, kde probíhalo měření.

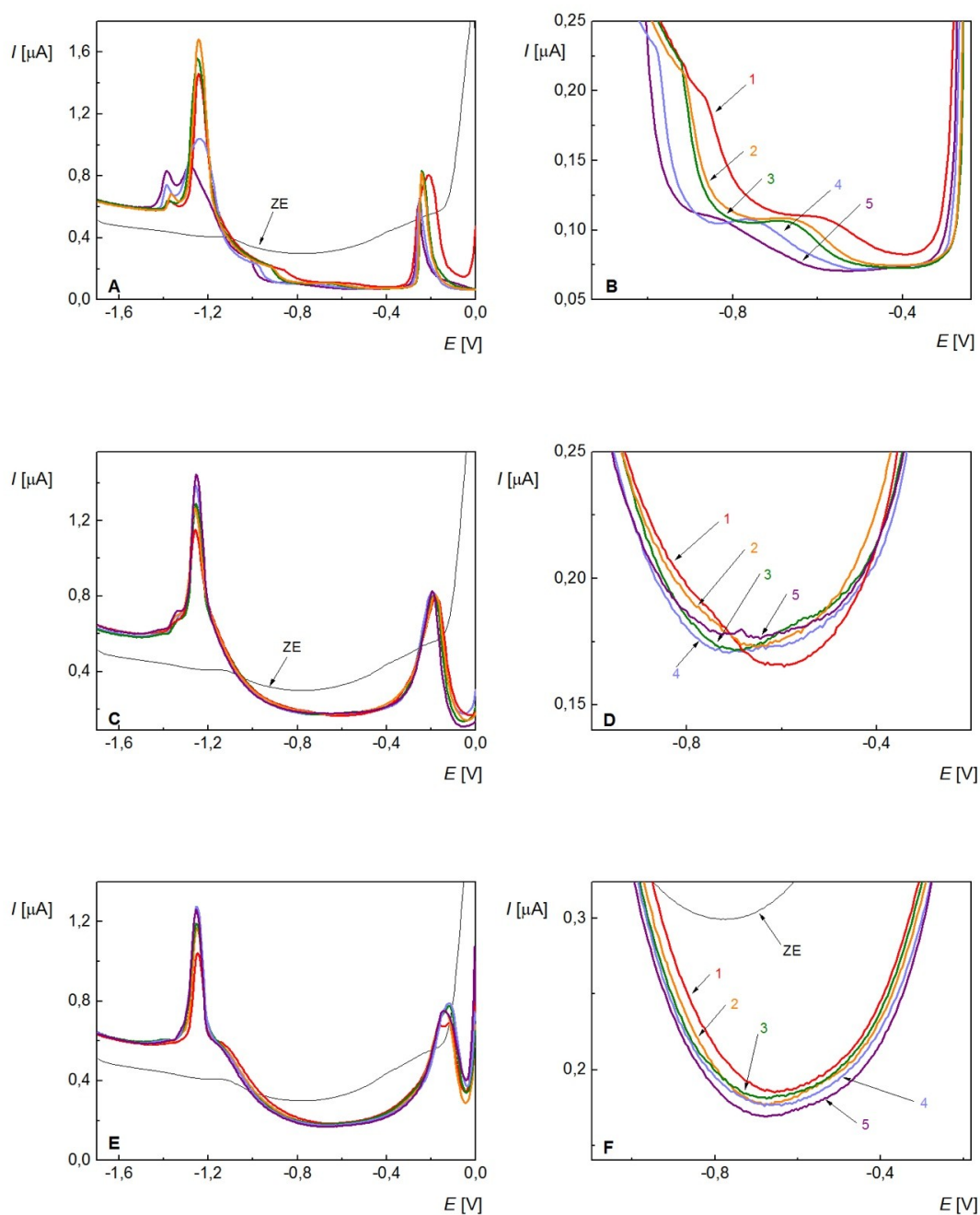
Byla studována adsorpce LCA pro tři koncentrace ( $c$  ( $\text{mol l}^{-1}$ ) =  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ), DCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) a CA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ). Adsorpce z roztoků o nižších koncentracích byly studovány pouze pro LCA, protože ta dle předběžných měření vykazovala nejlepší adsorpci na elektrodový povrch. Naměřené voltamogramy jsou znázorněny na obr. 13–15. Z voltamogramů je vidět, že se kapacitní jáma všech studovaných kyselin rozšiřuje se stoupající délkou adsorpce. Tento trend je zdaleka nejvýraznější pro LCA a nejvyšší koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  (obr. 13 A, B), kdy je hrana jámy dobře zřetelná v rozmezí  $-0,8 \text{ V}$  až  $-1,1 \text{ V}$  v závislosti na době adsorpce. Hodnota potenciálu  $E_2$  zápornější hrany kapacitní jámy DCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) a CA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) se pohybuje v rozmezí  $-1,1 \text{ V}$  až  $-1,2 \text{ V}$  a hrana není příliš výrazná, stejně jako rozdíly pro jednotlivé časy adsorpce. Totéž platí pro nižší koncentrace LCA ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  – obr. 13 C, D;  $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  – obr. 13 E, F). Tyto trendy jsou zřejmé na grafickém znázornění vývoje potenciálu  $E_2$  hrany kapacitní jámy na čase adsorpce (obr. 16). Z obrázku je zřejmé, že po 30 vteřině dochází k saturaci a s dalším navýšením doby adsorpce je posun  $E_2$  k zápornějším potenciálům nevýrazný.

Pozitivnější hrana kapacitní jámy  $E_2$  je ohraničena kapacitním píkem kolem  $-0,2 \text{ V}$  pouze v případě LCA. Tento je zhruba bez rozdílu výšky a potenciálu pro různé doby adsorpce. V případě DCA a CA není tento pík evidentní, ale pokles křivky oproti ZE je stále výrazný.

Výška faradaického píku u  $-1,2 \text{ V}$  stoupá se zvětšením doby adsorpce pro DCA a CA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) a pro nižší koncentrace LCA ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  a  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ). Pro koncentraci  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  výška píku kolem  $-1,2 \text{ V}$  stoupá v čase od 5 do 15 vteřin, při délce adsorpci 30 a 60 vteřin, tento pík klesá.

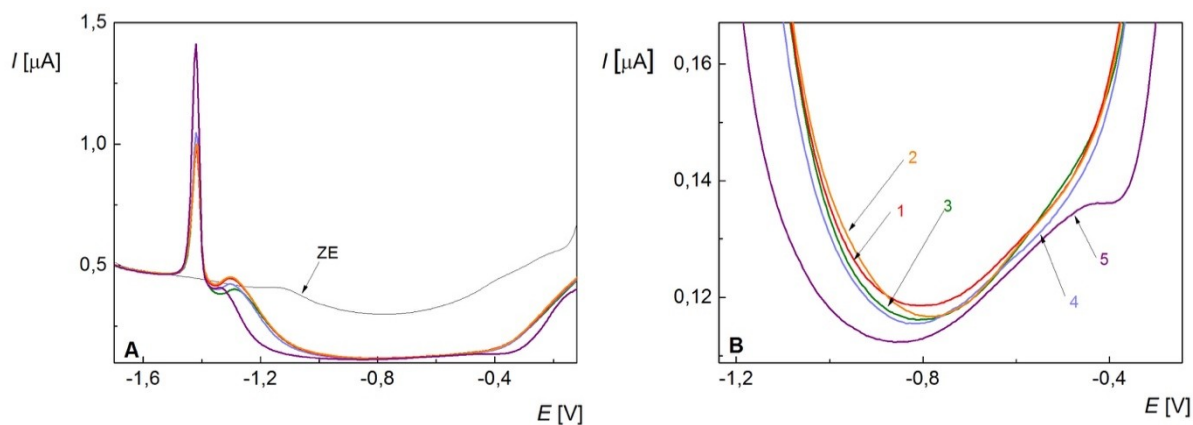
Z uvedených výsledků vyplývá, že studované žlučové kyseliny se adsorbují na povrch HMDE již po 5 s a tato adsorpce umožňuje jejich transfer. Chování LCA se

odlišuje od DCA a CA, kapacitní jáma je výrazně ohraničena na obou stranách. V případě koncentrace  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  dochází k 2D kondenzaci a výrazným změnám šířky kapacitní jámy s dobou adsorpce.

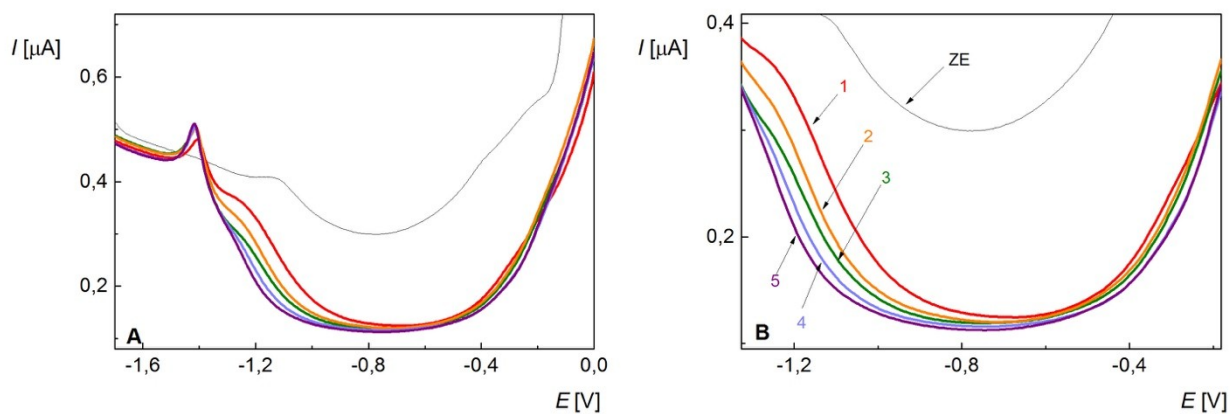


**Obr. 13** AC voltamogramy LCA měřené na HMDE v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol (9:1). Koncentrace LCA ( $\text{mol l}^{-1}$ ): A, B (B je výřez z A) –  $5 \cdot 10^{-4}$ ; C, D (D je výřez z C) –  $1 \cdot 10^{-4}$ ; E, F (F je výřez z E) –  $5 \cdot 10^{-5}$ . Doba adsorpce: (1) 5 s; (2) 10 s; (3) 15 s; (4) 30 s; (5) 60 s.

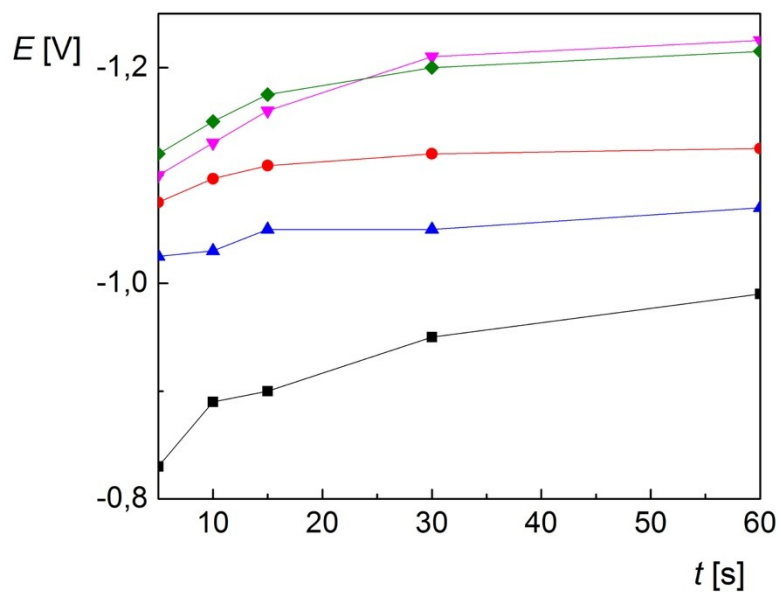




**Obr. 14** AC voltamogramy DCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) měřené na HMDE v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol (9:1). Doba adsorpce: (1) 5 s; (2) 10 s; (3) 15 s; (4) 30 s; (5) 60 s. B je výřez z A.



**Obr. 15** AC voltamogramy CA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) měřené na HMDE v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol (9:1). Doba adsorpce: (1) 5 s; (2) 10 s; (3) 15 s; (4) 30 s; (5) 60 s. B je výřez z A.



**Obr. 16** Závislost potenciálu  $E_2$  negativní hrany kapacitní jámy žlučových kyselin na době trvání adsorpce, naměřena pomocí ACV na HMDE v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol (9:1): (■) LCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ); (●) LCA ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ); (▲) LCA ( $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ); (▼) DCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ); (◆) CA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ).

### 3.4. Teplotní závislost diferenciální kapacity na potenciálu

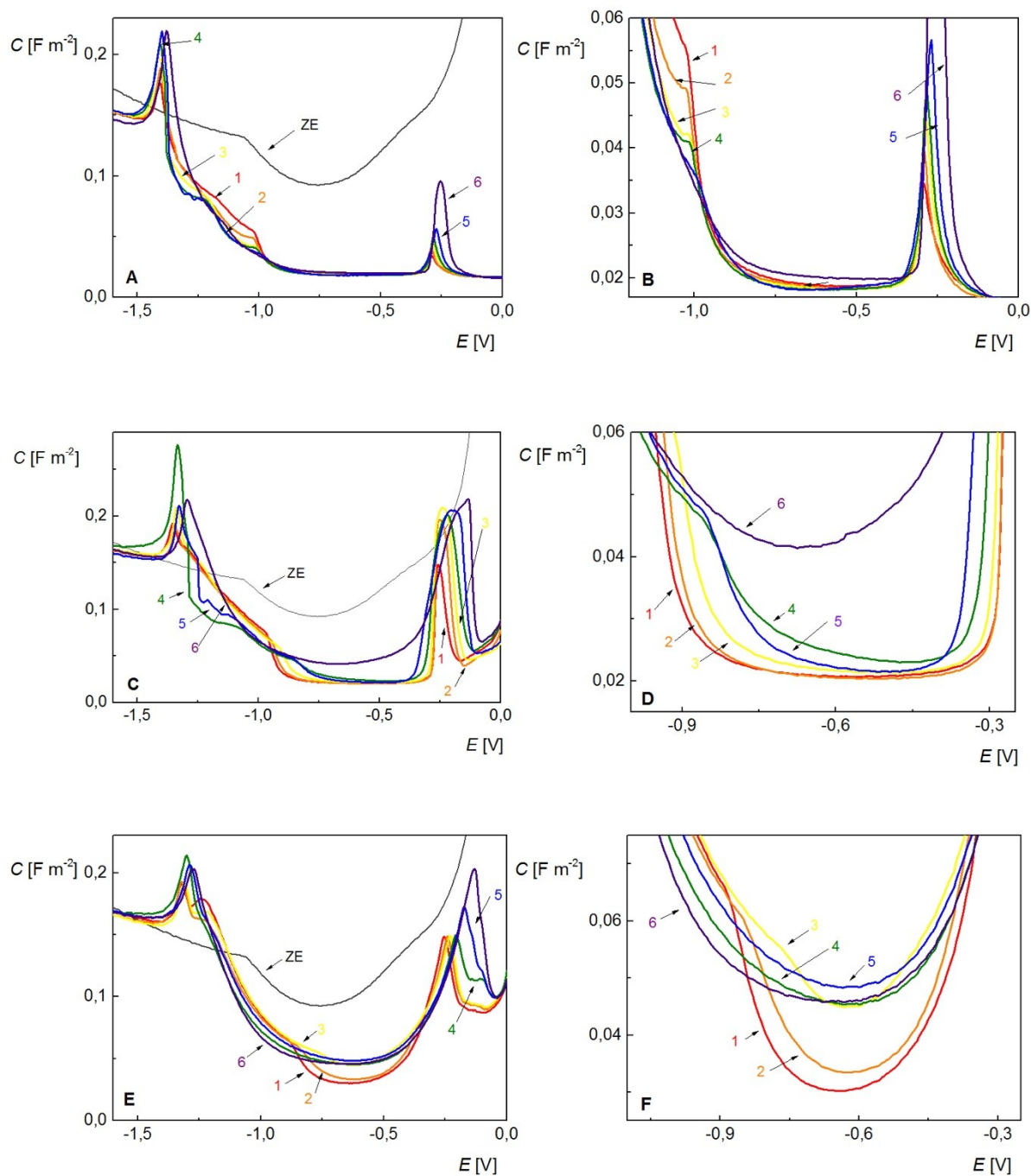
Teplotní závislost ( $T = 278,15 \text{ K} - 313,15 \text{ K}$ ) pro LCA, DCA a CA ( $c \text{ (mol l}^{-1}\text{)} = 5 \cdot 10^{-5}, 1 \cdot 10^{-4}, 5 \cdot 10^{-4}$ ) byla studována proměřením závislosti diferenciální kapacity  $C_d$  na potenciálu. Hodnoty  $C_d$  byly normalizované na plochu měřené kapky. Naměřené křivky v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol (9:1) jsou na obr. 17–19.

Hodnoty potenciálu obou hran kapacitní jámy  $E_1$  a  $E_2$  v závislosti na teplotě a kritická kondenzační teplota ( $T_{\text{krit}}$ ) jsou uvedené v tab. 9.

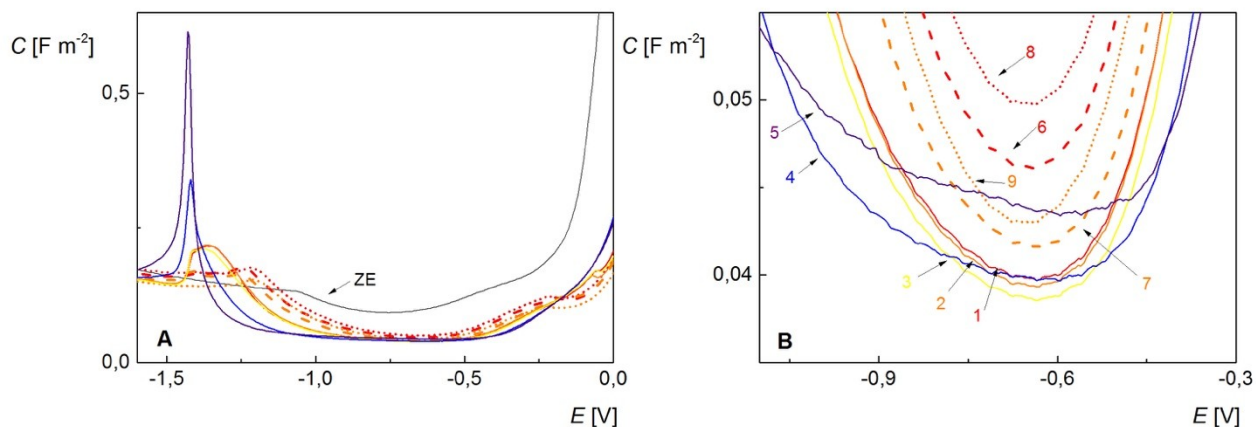
Obr. 17 znázorňuje teplotní závislost pro tři koncentrace LCA ( $c \text{ (mol l}^{-1}\text{)} = 5 \cdot 10^{-5}, 1 \cdot 10^{-4}, 5 \cdot 10^{-4}$ ). Pro všechny koncentrace a teploty je vidět kapacitní jáma. Výrazně ohraničená, tj. svědčící o 2D kondenzaci, je tato jáma pro obě vyšší koncentrace LCA. Při koncentraci  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  je 2D kondenzace v náznaku pouze u dvou nejnižších teplot, ale stále je pozorovatelná silná adsorpce. Ohraničení jámy v negativní části se stává se vzrůstající teplotou méně ostré, jáma se zužuje a její dno zvyšuje. Tento jev je typický pro 2D kapacitní jámy [76].

Již při 0 V dochází k silné adsorbci, a proto vidíme u  $-0,2 \text{ V}$  výrazný tenzametrický pík kvůli reorientaci molekul při tomto potenciálu, který se posouvá směrem k 0 V s rostoucí teplotou. Tento tenzametrický pík je patrný i při zpětném skenu, což svědčí o 2D kondenzaci a ruptuře 2D vrstvy při potenciálu kolem  $-0,2 \text{ V}$ . Negativní hrana kapacitní jámy  $E_2$  se s klesající koncentrací posouvá do kladnějších hodnot. U všech koncentrací LCA pozorujeme faradaický pík u  $-1,4 \text{ V}$ , který se nepatrně posouvá do kladnějších hodnot s rostoucí teplotou.

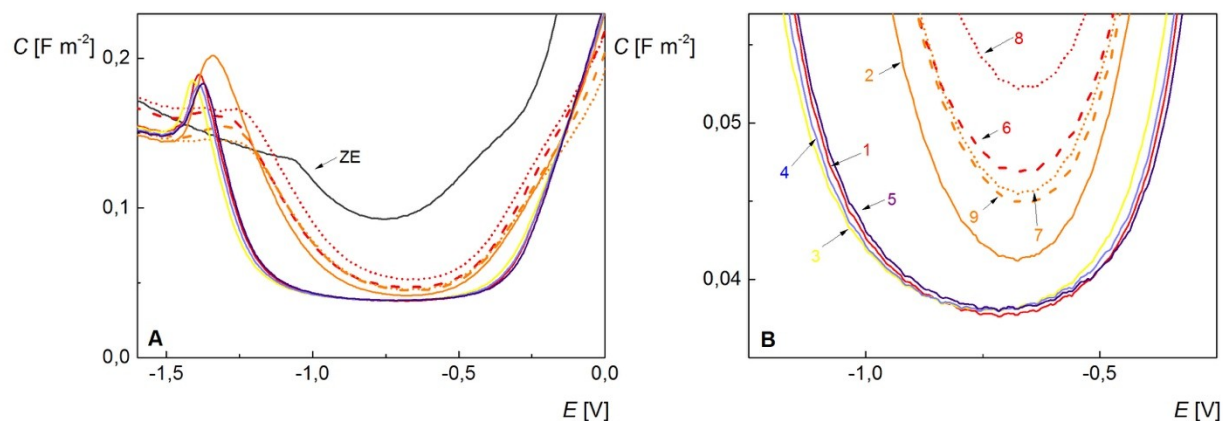
Na obrázcích 18, 19 jsou zobrazeny teplotní závislosti diferenciální kapacity  $C_d$  na potenciálu pro DCA a CA pro stejné koncentrace jako pro LCA ( $c \text{ (mol l}^{-1}\text{)} = 5 \cdot 10^{-5}, 1 \cdot 10^{-4}, 5 \cdot 10^{-4}$ ). Tenzametrický pík u  $-0,2 \text{ V}$  není pro tyto kyseliny vyvinut, výrazně ohraničená zápornější položená hrana kapacitní jámy  $E_2$  se objevuje pouze u vyšších koncentrací a nižších teplot. Tyto kyseliny se tedy na elektodu adsorbují, ale k 2D kondenzaci dochází pouze pro nižší teploty při vyšších koncentracích.



**Obr. 17** Voltamogramy závislosti diferenciální kapacity  $C_d$  na elektrodovém potenciálu  $E$ , naměřené na HMDE v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol (9:1). Koncentrace LCA ( $\text{mol l}^{-1}$ ): A, B (B je výřez z A) –  $5 \cdot 10^{-4}$ ; C, D (D je výřez z C) –  $1 \cdot 10^{-4}$ ; E, F (F je výřez z E) –  $5 \cdot 10^{-5}$ . Teplota [K]: (1) 278,15; (2) 283,15; (3) 288,15; (4) 293,15; (5) 303,15; (6) 313,15.



**Obr. 18** Voltamogramy závislosti diferenciální kapacity  $C_d$  na elektrodovém potenciálu  $E$ , naměřené na HMDE v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol (9:1). Koncentrace **DCA** ( $\text{mol l}^{-1}$ ): (1 – 5)  $5 \cdot 10^{-4}$ ; (6, 7)  $1 \cdot 10^{-4}$ ; (8, 9)  $5 \cdot 10^{-5}$ . Teplota [K]: (1, 6, 8) 278,15; (2, 7, 9) 283,15; (3) 288,15; (4) 303,15; (5) 313,15. B je výřez z A.



**Obr. 19** Voltamogramy závislosti diferenciální kapacity  $C_d$  na elektrodovém potenciálu  $E$ , naměřené na HMDE v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol (9:1). Koncentrace **CA** ( $\text{mol l}^{-1}$ ): (1 – 5)  $5 \cdot 10^{-4}$ ; (6, 7)  $1 \cdot 10^{-4}$ ; (8, 9)  $5 \cdot 10^{-5}$ . Teplota [K]: (1, 6, 8) 278,15; (2, 7, 9) 283,15; (3) 288,15; (4) 303,15; (5) 313,15. B je výřez z A.

**Tab. 9** Hodnoty potenciálu ( $E_1$ ,  $E_2$ ) hran kapacitní jámy v závislosti na teplotě, naměřené pro Cd-E závislost na HMDE v prostředí BR pufr (pH 11,0):methanol (9:1) v přítomnosti LCA, DCA a CA. Kritická kondenzační teplota ( $T_{krit}$ ) je zvýrazněna tučně.

Teplota [K]	Kyselina ( $c$ [mol l <sup>-1</sup> ])	$E_1$ [V]	$E_2$ [V]	Teplota [K]	Kyselina ( $c$ [mol l <sup>-1</sup> ])	$E_1$ [V]	$E_2$ [V]
278,15		-0,32	-0,93	278,15		-0,28	-0,93
283,15		-0,32	-0,92	283,15	LCA	-0,28	-0,92
288,15	LCA	-0,32	-0,93	288,15	( $1 \cdot 10^{-4}$ )	-0,29	-0,88
293,15	( $5 \cdot 10^{-4}$ )	-0,33	-0,93	293,15		-0,31	-0,82
303,15		-0,35	-0,88	<b>303,15</b>		-0,35	-0,83
313,15		-0,31	-0,9	313,15		-	-
278,15		-0,45	-0,82	278,15		-0,41	-1,1
<b>283,15</b>		-0,46	-0,78	283,15	DCA	-0,4	-1,1
288,15	LCA	-	-	288,15	( $5 \cdot 10^{-4}$ )	-0,39	-1,05
303,15	( $5 \cdot 10^{-5}$ )	-	-	303,15		-0,34	-1,19
313,15		-	-	313,15		-0,33	-1,25
278,15		-	-	278,15		-	-
283,15		-	-	283,15		-	-
288,15	DCA	-	-	288,15	DCA	-	-
293,15	( $1 \cdot 10^{-4}$ )	-	-	293,15	( $5 \cdot 10^{-5}$ )	-	-
303,15		-	-	303,15		-	-
313,15		-	-	313,15		-	-
278,15		-0,3	-1,18	278,15		-	-
283,15		-0,37	-1,01	283,15	CA	-	-
288,15	CA	-0,3	-1,21	288,15	( $1 \cdot 10^{-4}$ )	-	-
303,15	( $5 \cdot 10^{-4}$ )	-0,29	-1,19	303,15		-	-
313,15		-0,28	-1,18	313,15		-	-
278,15		-	-				
283,15		-	-				
288,15	CA	-	-				
293,15	( $5 \cdot 10^{-5}$ )	-	-				
303,15		-	-				
313,15		-	-				

### 3.5. Vliv přítomnosti aniontů v základním elektrolytu na adsorpční chování žlučových kyselin

2D kondenzace je výrazně ovlivněna ionty přítomnými v okolním prostředí a záleží na typu stabilizační interakce 2D jam [68].

Pro studium vlivu základního elektrolytu na adsorpci žlučových kyselin byly zvoleny následující základní elektrolyty:  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  NaOH a NaCl/NaBr/NaI o různých koncentracích, rozpuštěné v  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  NaOH. Tyto ionty vykazují vlastní interakci s povrchem elektrody, nebo mohou ovlivňovat struktury 2D kondenzovaných a adsorbovaných vrstev žlučových kyselin. Lze předpokládat, že potenciál elektrokapilárního maxima  $E_{pzc}$  se posouvá k negativním potenciálům v pořadí  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  [68]. Zároveň klesá elektronegativita těchto halogenů a stoupá polarizovatelnost, tj. jod má nejnižší elektronegativitu a nejvyšší polarizovatelnost.

Byla studována adsorpce tří koncentrací LCA ( $c \text{ (mol l}^{-1}) = 5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ), a DCA a CA pro nejvyšší dosud studovanou koncentraci ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ), při které docházelo k nejvýraznější adsorpci na HMDE. Byla provedena komplexní studie: měření při měnící se koncentraci kyseliny a konstantní koncentraci iontu (obr. 20) měření při konstantní koncentraci kyseliny a měnící se koncentraci iontu (obr. 23), porovnání voltamogramů kyselin při stejné koncentraci iontu i kyseliny (obr. 21). Hodnoty potenciálů ( $E_1$ ,  $E_2$ ) hran kapacitní jámy pro LCA, DCA a CA v závislosti na složení základního elektrolytu jsou uvedeny v tab. 10. Grafické znázornění vývoje potenciálu hrany kapacitní jámy  $E_1$ ,  $E_2$  v přítomnosti jednotlivých aniontů je uvedeno na obr. 22.

Na obr. 20 jsou zobrazeny AC voltamogramy LCA ( $c \text{ (mol l}^{-1}) = 5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ) pro základní elektrolyt  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  NaOH a základní elektrolyt obsahující konstantní koncentraci iontů:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  ( $c = 0,5 \text{ mol l}^{-1}$ ). Po přidavku aniontů dochází k posunu negativnější hrany jámy o *ca* 0,2 V k pozitivnějším hodnotám. Na voltamogramech můžeme pozorovat, že jáma se zužuje v pořadí  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$  pro všechny koncentrace LCA. V přítomnosti všech halogenidů je negativní hrana jámy při přibližně stejném potenciálu, tj. zúžení jámy je dáno posunem pozitivněji položené hrany (obr. 22).

Zatímco výrazné změna byla zaznamenána mezi přidavkem  $\text{Br}^-$  a  $\text{I}^-$ , pro přidavek  $\text{Cl}^-$  a  $\text{Br}^-$  není rozdíl příliš velký, a to ani v případě dalších dvou studovaných kyselin DCA a CA (obr. 21, 23). Dále je evidentní, že kapacitní jáma LCA je posunuta do více pozitivních hodnot a je položená níže, než kapacitní jámy CA a DCA (obr. 21). Toto jsou nejzákladnější porovnání z naměřených AC voltamogramů ohledně rozboru adsorpčního chování.

Z naměřených AC voltamogramů lze dále vysledovat následující jevy:

Pro LCA je faradaický pík u  $-1,4$  V výrazný v přítomnosti halogenidů, a to zhruba bez rozdílu výšky pro různé koncentrace LCA pro NaBr. V případě NaCl a NaI s klesající koncentrací LCA výška tohoto píku stoupá. Pro koncentraci LCA  $5 \cdot 10^{-5}$  mol  $\text{l}^{-1}$  se pík posouvá do pozitivních hodnot. Příčina těchto fluktuací je nejasná, nicméně je evidentní, že faradaický signál nelze použít pro kvantifikaci LCA. Pro CA a DCA při použití roztoku  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $\text{l}^{-1}$  NaOH bez halogenidů jako základního elektrolytu faradaický pík u  $-1,4$  V nepozorujeme. V přítomnosti iontů halogenidů pík u  $-1,4$  V roste v pořadí  $\text{LCA} < \text{CA} < \text{DCA}$ , pokud porovnáme voltamogramy pro stejnou koncentraci kyselin  $5 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{l}^{-1}$  (obr. 21). Toto pořadí by tedy mělo odrážet přístupnost karboxylové skupiny pro redukci protonu; nejvíce adsorbovaná kyselina (LCA) má nejvyšší signál. Vzhledem k tomu, že kyseliny jsou ve studovaném pH disociované, lze redukci protonu posuzovat jako děj katalyzovaný přítomností kyseliny, naadsorbované na povrch elektrody.

Dále můžeme pozorovat tenzametrický pík u  $-0,2$  V. Pro NaCl platí, že s rostoucí koncentrací kyseliny tento pík klesá. V případě s NaBr a NaI tenzametrický pík je mnohem vyšší a není závislý na koncentraci LCA.

Na obr. 23 je zobrazena závislost LCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{l}^{-1}$ ) na koncentraci halogenidů. Pro samotnou LCA v roztoku  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $\text{l}^{-1}$  NaOH bez přidání halogenidů má negativní hrana nejvíce negativní hodnoty potenciálu, s rostoucí koncentrací halogenidů se kapacitní jáma posouvá směrem ke kladnějším hodnotám, nejvýraznější je posun pro jodidové ionty. Výrazná negativní hrana jámy se objevuje od koncentrace halogenidů  $50$  mmol  $\text{l}^{-1}$ . Opět je jasně vidět, že jáma se se vždy zužuje v pořadí  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ . Hodnoty potenciálů ( $E_1$ ,  $E_2$ ) hrán kapacitní jámy LCA pro různé koncentrace halogenidů jsou uvedeny v tab. 11. Grafické znázornění vývoje potenciálu

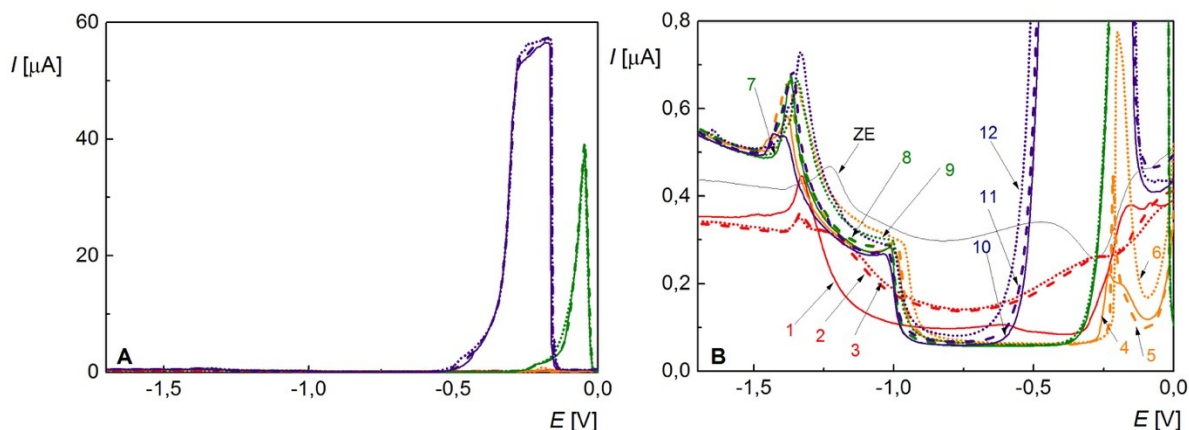


hrany kapacitní jámy v závislosti na koncentraci halogenidových aniontů v základním elektrolytu je uvedeno na obr. 24.

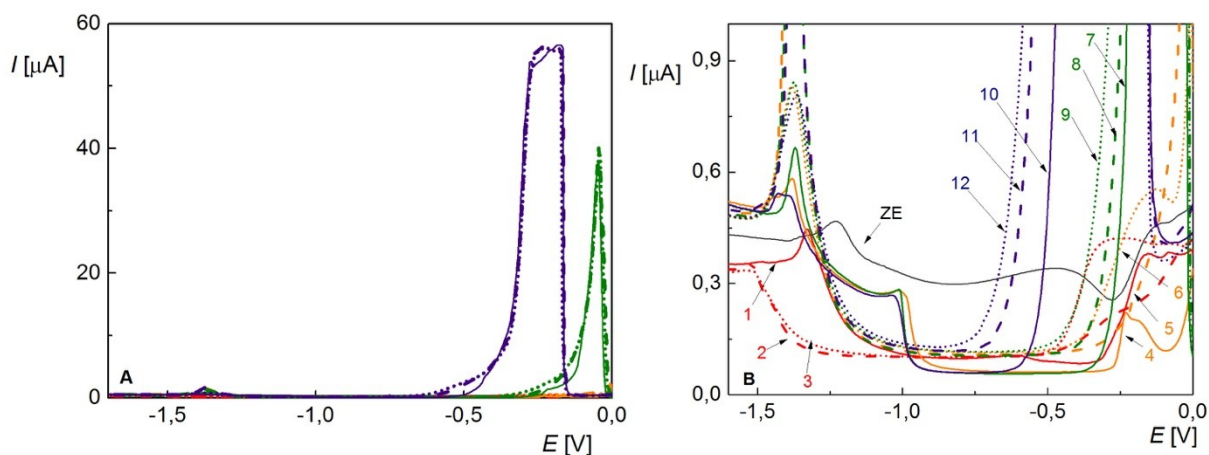
Tenzametrický pík v rozmezí 0 V až  $-0,5$  V dle typu halogenidu je viditelný jako velký nárůst proudu: pro chloridové a bromidové ionty se začíná tvořit od  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  a vyšší, pro jodidové již od  $5 \text{ mmol l}^{-1}$ .

Závěrem lze konstatovat, že chování všech studovaných žlučových kyseliny je v přítomnosti chloridových a bromidových iontů přibližně stejné, výrazný rozdíl je v přítomnosti jodidových aniontů. Pro tento iont je ale známá tvorba  $\text{Hg}_2\text{I}_2$ , který se silně adsorbuje na povrch elektrody jako takzvaný „černý film“ [68]. Tento film se při negativnějších potenciálech rozpouští a způsobuje velký nárůst proudu/kapacity. Zúžení jámy není tedy zřejmě dáno chováním žlučových kyselin, ale tímto jevem. Celkově lze říct, že není významný rozdíl chování žlučových kyselin v přítomnosti různých halogenidů, což svědčí o jiném druhu interakce žlučových kyselin s povrchem elektrody a mezi sebou než jsou vodíkové můstky. Ty jsou hlavní vazební interakcí pro vznik 2D kondenzovaných vrstev v případě dusíkatých bází nukleových kyselin a jejich halogenovaných a methylovaných derivátů [70, 71, 76].

Velký rozdíl je zřetelný, pokud je v roztoku samotná žlučová kyselina a pokud je přítomen kterýkoliv halogenid. V jeho přítomnosti se prohlubuje kapacitní jáma, to znamená, že halogenid projevuje „vysolovací“ efekt a přispívá k adsorpci žlučových kyselin na povrchu elektrody. Žlučové kyseliny mají značnou část v podstatě hydrofobní a inklinují tedy k adsorpci na povrch elektrody, obzvláště v oblasti elektrokapilárního maxima, kdy je elektroda slabě záporně či kladně nabitá. Tento efekt je nejvýraznější pro LCA, která má pouze jednu hydroxylovou skupinu, která je umístěná na konci molekuly a a vyčnívá z relativně kompaktní hydrofobní struktury LCA do prostoru. Hydrofobní část je pak k dispozici pro interakci s povrchem elektrody nebo další LCA. Adsorpční chování BA je tedy v souladu se znalostmi ohledně struktury žlučových kyselin. Zakřivený tvar jejich řetězců umožňuje cyklizaci molekul, a tím i tvorbu supramolekulární struktury.



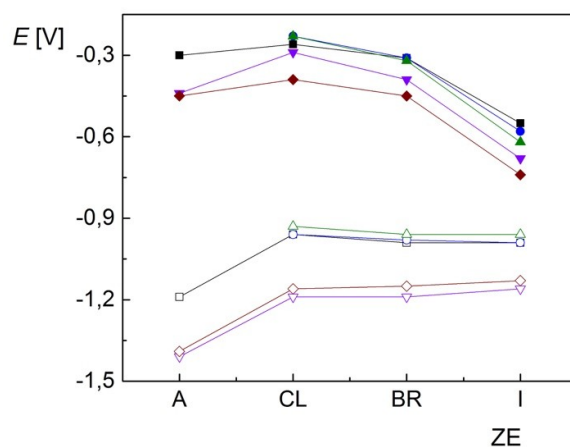
**Obr. 20** AC voltamogramy LCA měřené na HMDE v prostředí: červeně (1 – 3) –  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH:methanol (9:1)}$ ; oranžově (4 – 6) –  $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaCl v } 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH:methanol (9:1)}$ ; zeleně (7 – 9) –  $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaBr v } 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH:methanol (9:1)}$ ; modře (10 – 12) –  $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaI v } 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH:methanol (9:1)}$ . Koncentrace LCA ( $\text{mol l}^{-1}$ ): plná čára (1, 4, 7, 10) –  $5 \cdot 10^{-4}$ ; přerušovaně (2, 5, 8, 11) –  $1 \cdot 10^{-4}$ ; tečkovaně (3, 6, 9, 12) –  $5 \cdot 10^{-5}$ . B je výřez z A.



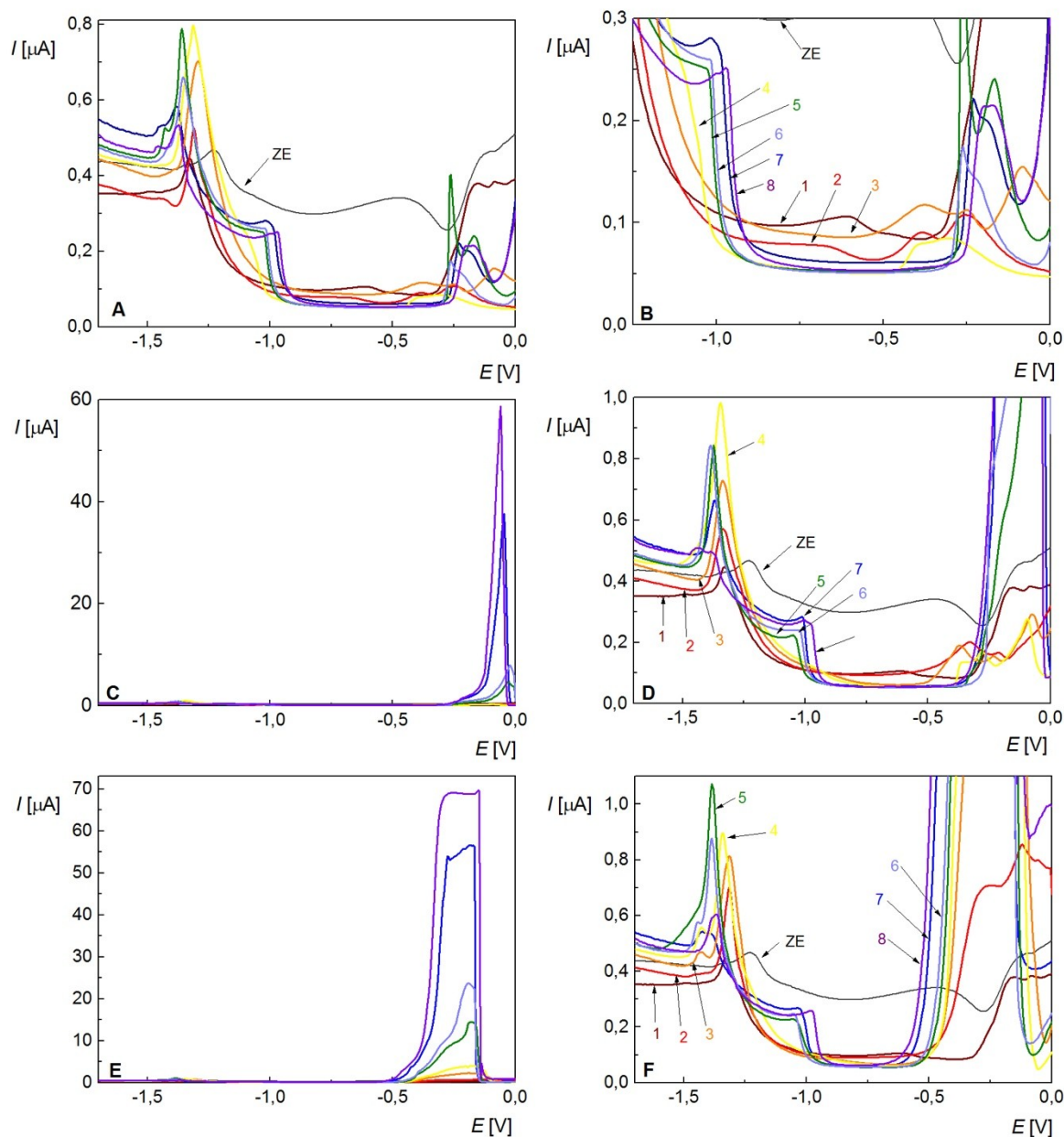
**Obr. 21** AC voltamogramy žlučových kyselin, měřené na HMDE v prostředí: červeně (1 – 3) –  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH:methanol (9:1)}$ ; oranžově (4 – 6) –  $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaCl v } 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH:methanol (9:1)}$ ; zeleně (7 – 9) –  $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaBr v } 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH:methanol (9:1)}$ ; modře (10 – 12) –  $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaI v } 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH:methanol (9:1)}$ . Měřené žlučové kyseliny ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ): plná čára (1, 4, 7, 10) – LCA; přerušovaně (2, 5, 8, 11) – DCA; tečkovaně (3, 6, 9, 12) – CA. B je výřez z A.

**Tab. 10** Hodnoty potenciálu ( $E_1$ ,  $E_2$ ) hran kapacitní jámy v závislosti na základním elektrolytu, naměřené pomocí ACV na HMDE v prostředí: **A** –  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  NaOH:methanol (9:1); **CL** –  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  NaCl v  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  NaOH:methanol (9:1); **BR** –  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  NaBr v  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  NaOH:methanol (9:1); **I** –  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  NaI v  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  NaOH:methanol (9:1).

Prostředí	Kyselina ( $c$ [mol l <sup>-1</sup> ])	$E_1$ [V]	$E_2$ [V]	Kyselina ( $c$ [mol l <sup>-1</sup> ])	$E_1$ [V]	$E_2$ [V]
A		-0,3	-1,19		–	–
CL	LCA	-0,26	-0,96	LCA	-0,23	-0,96
BR	( $5 \cdot 10^{-4}$ )	-0,31	-0,99	( $1 \cdot 10^{-4}$ )	-0,31	-0,98
I		-0,55	-0,99		-0,58	-0,99
A		–	–			
CL	LCA	-0,23	-0,93			
BR	( $5 \cdot 10^{-5}$ )	-0,32	-0,96			
I		-0,62	-0,96			
A		-0,44	-1,41		-0,45	-1,39
CL	DCA	-0,29	-1,19	CA	-0,39	-1,16
BR	( $5 \cdot 10^{-4}$ )	-0,39	-1,19	( $5 \cdot 10^{-4}$ )	-0,45	-1,15
I		-0,68	-1,16		-0,74	-1,13



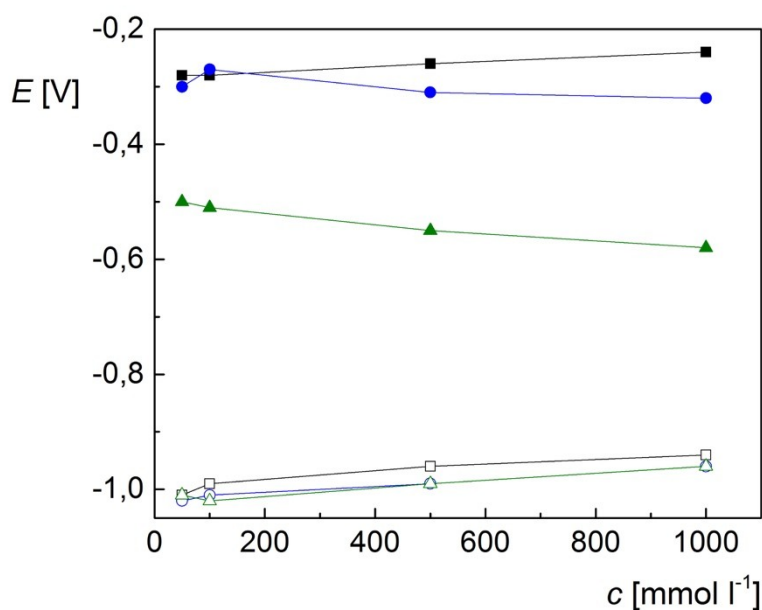
**Obr. 22** Závislost potenciálu ( $E_1$ ,  $E_2$ ) hrany kapacitní jámy žlučových kyselin na základním elektrolytu, naměřena pomocí ACV na HMDE v prostředí: **A** –  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  NaOH:methanol (9:1); **CL** –  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  NaCl v  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  NaOH:methanol (9:1); **BR** –  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  NaBr v  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  NaOH:methanol (9:1); **I** –  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  NaI v  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  NaOH:methanol (9:1). Měřené žlučové kyseliny (■) LCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ); (●) LCA ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ); (▲) LCA ( $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ); (▼) DCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ); (◆) CA ( $c = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ).



**Obr. 23** AC voltamogramy LCA měřené na HMDE v prostředí: A, B (B je výřez z A) – NaCl o různých  $c$  v  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$  NaOH:methanol (9:1); C, D (D je výřez z C) – NaBr o různých  $c$  v  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$  NaOH:methanol (9:1); E, F (F je výřez z E) – NaI o různých  $c$  v  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$  NaOH:methanol (9:1). Koncentrace NaCl (A, B), NaBr (C, D), NaI (E, F) ( $mmol\ l^{-1}$ ): (1) 0; (2) 1; (3) 5; (4) 10; (5) 50; (6) 100; (7) 500; (8) 1000.

**Tab. 11** Hodnoty potenciálu ( $E_1$ ,  $E_2$ ) hran kapacitní jámy v závislosti na koncentraci halogenidových aniontů v základním elektrolytu, naměřené pomocí ACV na HMDE v prostředí: NaCl o různých  $c$  v  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$  NaOH:methanol (9:1); NaBr o různých  $c$  v  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$  NaOH:methanol (9:1); NaI o různých  $c$  v  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$  NaOH:methanol (9:1).

$c$ [mmol $l^{-1}$ ]	$E_1$ [V]	$E_2$ [V]	$E_1$ [V]	$E_2$ [V]
50	-0,28	-1,01	-0,3	-1,02
100	-0,28	-0,99	-0,27	-1,01
500	-0,26	-0,96	-0,31	-0,99
1000	-0,24	-0,94	-0,32	-0,96
50	-0,50	-1,01		
100	-0,51	-1,02		
500	-0,55	-0,99		
1000	-0,58	-0,96		



**Obr. 24** Závislost potenciálu ( $E_1$ ,  $E_2$ ) hrany kapacitní jámy LCA ( $c = 5 \cdot 10^{-4}$  mol  $l^{-1}$ ) na koncentraci halogenidových aniontů v základním elektrolytu, naměřena pomocí ACV na HMDE v prostředí: (■) NaCl o různých  $c$  v  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$  NaOH:methanol (9:1); (●) NaBr o různých  $c$  v  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$  NaOH:methanol (9:1); (▲) NaI o různých  $c$  v  $1 \cdot 10^{-3}$  mol  $l^{-1}$  NaOH:methanol (9:1).

## Závěr

V této diplomové práci elektrochemické a adsorpční chování tří žlučových kyselin: kyseliny lithocholové, kyseliny deoxycholové a kyseliny cholové bylo studováno na visící rtuťové kapkové elektrodě metodami CV, ACV a měřením závislosti diferenciální kapacity  $C_d$  na vloženém potenciálu  $E$ . Měření probíhala v prostředí Brittonův-Robinsonův pufr:methanol v poměru 9:1.

O adsorpčním chování žlučových kyselin dosud nebyly publikovány žádné práce, kromě předběžných studií metodou cyklické voltametrie a diferenční pulzní voltametrie v rámci systematického studia v UNESCO laboratoři elektrochemie životního prostředí na Přírodovědecké fakultě UK.

Měření ukázala, že se žlučové kyseliny adsorbují na povrchu elektrody, kde dochází k samouspořádání – jedná se o 2D kondenzaci. Pomocí transferových technik bylo potvrzeno, že se žlučové kyseliny adsorbují na povrchu elektrody HMDE již po 5 s.

Studium chování kyseliny lithocholové v závislosti na různých hodnotách pH ukázalo, že pouze při pH 10,0 až 12,0 jsou vidět 2D jámy, to znamená že při hodnotách pH v rozmezí 2,0 až 9,0 nejde o 2D kondenzaci, ale o jiný druh adsorpce. Příčinou změny chování LCA v závislosti na pH je její rozpustnost a protonizace karboxylového aniontu. Na AC voltamogramech se nacházejí maximálně dvě oblasti, ve kterých se vyskytují píky: první je kolem  $-0,2$  V a druhá je kolem  $-1,2$  V až  $-1,4$  V. Oba píky jsou srovnatelné s píky na cyklickém voltamogramu. Chování LCA je zásadně jiné než pro DCA a CA, jelikož v případě LCA je na voltamogramech pozorovatelných více signálů, obzvláště v zásaditých prostředích, na rozdíl od obou dalších kyselin, které vykazují pouze jeden katodický signál při potenciálu kolem  $-1,2$  V až  $-1,4$  V.

Měření teplotní závislosti diferenciální kapacity na potenciálu bylo provedeno pro tři koncentrace žlučových kyselin ( $c$  ( $\text{mol l}^{-1}$ ) =  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ). K 2D kondenzaci u LCA dochází pro obě vyšší koncentrace. Při koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$   $\text{mol l}^{-1}$  je 2D kondenzace v náznaku pouze u nejnižších teplot, ale stále je pozorovatelná silná adsorpce. DCA a CA se na elektrodu adsorbují, ale k 2D kondenzaci dochází pouze pro nižší teploty při vyšších koncentracích.

Byl studován vliv přítomnosti halogenidových aniontů v základním elektrolytu na adsorpční chování žlučových kyselin. Ukázalo se, že v přítomnosti iontů halogenidů pík u  $-1,4$  V roste v pořadí  $LCA < CA < DCA$ . Toto pořadí odráží přístupnost karboxylové skupiny pro redukci protonu. Lze konstatovat, že chování všech studovaných žlučových kyseliny je v přítomnosti chloridových a bromidových iontů přibližně stejné, výrazný rozdíl je v přítomnosti jodidových aniontů, zúžení jámy ale je dáno tvorbou  $Hg_2I_2$ , který se silně adsorbuje na povrch elektrody, nikoliv chováním žlučových kyselin. Podobné chování žlučových kyselin v přítomnosti různých halogenidů svědčí o tom, že interakce žlučových kyselin s povrchem elektrody a mezi sebou je jiná, než jsou vodíkové můstky. Vzhledem ke struktuře žlučových kyselin lze předpokládat, že se jedná o hydrofobní interakce.

Všechna měření ukázala, že 2D kondenzace u LCA je výraznější oproti DCA a CA

## Literatura

1. Koolman J., Röhm K.-H.: *Color Atlas of Biochemistry*. New York: Thieme Stuttgart (2005).
2. Hofmann, A. F., & Hagey, L. R.: *Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades*. Journal of Lipid Research, 55(8), 1553–1595 (2014).
3. Pyrek J. St., Lee S.P., Thomsen L., Tasman-Jones C., Leydon B.: *Bile acids of marsupials. 2. Hepatic formation of vulpecholic acid (1 alpha,3 alpha,7 alpha-trihydroxy-5 beta-cholan-24-oic acid) from chenodeoxycholic acid in a marsupial, Trichosurus vulpecula*. The Journal of Lipid Research, 32, 1417–1427 (September 1991).
4. [https://en.wikipedia.org/wiki/Bile\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Bile_acid), 12. 04. 2020
5. Hofmann A.F., Hagey L.R.: *Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics*. Cellular and Molecular Life Sciences 65, 2461–2483 (2008).
6. Monte M. J.; Marin J. J. G.; Antelo A.; Vazquez-Tato J.: *Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology*. World Journal of Gastroenterology 15, 804 – 816 (2009).
7. Mukhopadhyay S.; Maitra U.: *Chemistry and biology of bile acids*. Current Science 87, 1666 – 1683 (2004).
8. Thomas Ch.; Pellicciari R.; Pruzanski M.; Auwerx J.; Schoonjans K.: *Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases*. Nature Reviews Drug Discovery 7:8, 678–693 (2008).
9. Chiang, J. Y. L.: *Bile Acid Metabolism*. S.P.S. Monga (ed.), Molecular Pathology of Liver Diseases, Molecular Pathology Library 5, 165–179 (2010).
10. Carey M.C., Danielsson H., Sjovall J. in: *Sterols and Bile Acids*. Elsevier, Amsterdam, 231 – 233 (1985).
11. Pecková K.; Nesměrák K.: *Electrochemistry of bile acids, cholesterol, and related compounds*. Sensing in Electroanalysis, Vol. 7. Kalcher K.; Metelka R.; Švancara I.; Vytřas K. (Eds.), University Press Centre, Pardubice, 87 – 96 (2012).



12. Roda A.; Minutello A.; Angellotti M. A.; Finit A.: *Bile acid structure-activity relationship: Evaluation of bile acid lipophilicity using I-octanol/water partition coefficient and reverse phase HPLC*. Journal of Lipid Research 31, 1433 – 1443 (1990).
13. Hofmann A. F.; Rods A.: *Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem*. Journal of Lipid Research 25, 1477 – 1489 (1984).
14. Stamp D.; Jenkins G.: *An overview of bile-acid synthesis, chemistry and function*. In: Issues in Toxicology, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1 – 13 (2008).
15. Nakamura R.; Takeuchi R.; Kuramochi K.; Mizushina Y.; Ishimaru C.; Takakusagi Y.; Takemura M.; Kobayashi S.; Yoshida H.; Sugawara F.; Sakaguchi K.: *Chemical properties of fatty acid derivatives as inhibitors of DNA polymerases*. Organic and Biomolecular Chemistry 5, 3912 – 3921 (2007).
16. <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000917>, 10.08.2020
17. [https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB1285736\\_EN.htm](https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB1285736_EN.htm), 10.08.2020
18. Tamminen J.; Kolehmainen E.: *Bile acids as building blocks of supramolecular hosts*. Molecules 6, 21 – 46 (2001).
19. Davis A. P.: *Bile acid scaffolds in supramolecular chemistry: The interplay of design and synthesis*. Molecules 12, 2106 – 2122 (2007).
20. Vecka M., Žák A., Staňková B., Fojtiková Š., Tomášová P., Kutová S.: *Žlučové kyseliny – malé molekuly velkých možností*. Chemické listy 113, 82–89 (2019).
21. Knudtson C.A., Diaas J.R.: *Recent methods for diversification of bile acids and related steroids towards supramolecular*. Steroids 151, 1–14 (2019).
22. Miyata M.; Tohnai N.; Hisaki I.: *Supramolecular chirality in crystalline assemblies of bile acids and their derivatives; three-axial, tilt, helical, and bundle chirality*. Molecules 12, 1973 – 2000 (2007).
23. [https://en.wikipedia.org/wiki/Lithocholic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Lithocholic_acid), 11.04.2020
24. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9903#section=Top>, 20. 04. 2020
25. Kozoni V.; Tsioulas G.; Shiff S.; Rigas B.: *The effect of lithocholic acid on proliferation and apoptosis during the early stages of colon carcinogenesis:*

- Differential effect on apoptosis in the presence of a colon carcinogen. Carcinogenesis.*, s. 999–1005 (2000).
26. Goldberg A. A.; Beach A.; Davies G. F.; Harkness T. A.; Leblanc A.; Titorenko V. I. *Lithocholic bile acid selectively kills neuroblastoma cells, while sparing normal neuronal cells. Oncotarget.*, s. 761–782 (2011).
  27. Ishizawa M.; Matsunawa M.; Adachi R.; Uno S.; Ikeda K.; Masuno H.; Shimizu M.: *Lithocholic acid derivatives act as selective vitamin D receptor modulators without inducing hypercalcemia. The Journal of Lipid Research.*, s. 763–772 (2008).
  28. [https://en.wikipedia.org/wiki/Deoxycholic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Deoxycholic_acid), 11.04.2020
  29. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/222528#section=Top>, 20. 04. 2020
  30. Neugebauer, J.M. *Detergents: An Overview* in M.P. Deutscher, Guide to Protein Purification (Methods in Enzymology Vol. 182), Academic Press, San Diego (1990).
  31. Fredriksen J. H.; Rosenqvist E.; Wedege E.: *Production, characterization and control of MenB-vaccine "Folkehelsa": an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease. NIPH Ann.* 12, s. 67–80 (1991).
  32. [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB8325514.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8325514.htm), 20. 04. 2020
  33. [https://en.wikipedia.org/wiki/Cholic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Cholic_acid) , 11.04.2020
  34. [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cholic\\_acid#section=IUPAC-Name](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cholic_acid#section=IUPAC-Name), 20. 04. 2020
  35. [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB9263222.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9263222.htm), 20. 04. 2020
  36. Schmidt E.J., Boswell J.S., Walsh J.P., Schellenberg M.M.: *Activities of cholic acid-derived antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 671–674 (2001).
  37. Haslewood G. A. D.: *Bile salt evolution. Journal of Lipid Research* 8:6, 535–550 (1967).
  38. Murray R.K. et al. *Harperova Biochemie*. 4. vyd. Praha: H & H (2002).
  39. Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J.. *Biochemie pro studující medicíny*. 2. vyd. Praha: Karolinum (2009).

40. Kittnar O. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011.
41. Dawson P.A. and Karpen S.J.: *Intestinal transport and metabolism of bile acids*. J. Lipid Res., 56, 1085-1099 (2015).
42. Ahmad T.R., Haeusler R.A.: *Bile acids in glucose metabolism and insulin signalling - mechanisms and research needs*. Nature Rev. Endocrin., 15, 701-712 (2019).
43. Molinaro A., Wahlstrom A., Marschall, H.U. *Role of bile acids in metabolic control*. Trends Endocrinol. Metab., 29, 31-41 (2018).
44. Yilmaz U.T.; Uzun D.; Yilmaz H.: *A new method for rapid and sensitive determination of cholic acid in gallbladder bile using voltammetric techniques*. Microchemical journal 122, 159 – 163 (2015).
45. Ferri T.; Campanella L.; De Andelis G.: *Differential-pulse polarographic determination of cholic acids*; Analyst 109, 923 – 925 (1984).
46. Griffiths W. J.; Sjövall J.: *Bile acids: Analysis in biological fluids and tissues*. Journal of Lipid Research 51, 23 – 41 (2010).
47. Scalia S.: *Bile acid separation*. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications 671, 299 – 317 (1995).
48. Kakiyama G., Hosoda A., Iida T., Fujimoto Y., Goto T., Mano N., Goto J., Nambara T.: *A direct method for separation and quantification of bile acid acyl glycosides by High-Performance Liquid Chromatography with an evaporative light scattering detector*. Journal of Chromatography A, 1125(1), 112–116 (2006).
49. Araki Y., Mukaisyo K., Sugihara H., Fujiyama Y., Hattori T.: *Detection of N-nitroso-bile acids at 285 nm in reverse-phase HPLC*. Journal of Separation Science 31 (15), 2827–2830 (2008).
50. Wu Y.; Wang X.; Wu Q.; Wu X.; Lin X.; Xie Z.: *Separation and determination of structurally related free bile acids by pressurized capillary electrochromatography coupled to laser induced fluorescence detection*. Analytical Methods 2, 1927 – 1933 (2010).
51. Danese E., Salvagno G. L., Negrini D., Brocco G., Montagnana, M., & Lippi, G.: *Analytical evaluation of three enzymatic assays for measuring total bile*

- acids in plasma using a fully-automated clinical chemistry platform.* PLOS ONE, 12(6) (2017).
52. Klouda J., Berek J., Nesměrák K., Schwarzová-Pecková K.: *Non-Enzymatic Electrochemistry in Characterization and Analysis of Steroid Compounds.* Critical Reviews in Analytical Chemistry, 47 (5), 384-404 (2017).
  53. Klouda J., Berek J., Kocovsky P., Herl T., Matysik F.M., Nesmerak K., Schwarzova-Peckova K.: *Bile acids: Electrochemical oxidation on bare electrodes after acid-induced dehydration,* Electrochemistry Communications, 86, 99-103, (2018).
  54. Klouda J., Nesmerak K., Kocovsky P., Berek J., Schwarzova-Peckova K.: *A novel voltammetric approach to the detection of primary bile acids in serum samples,* Bioelectrochemistry, 134 (2020).
  55. Liu X., Wang L., Zhang S., Deng X., Tang X., Huang X.: *Electrochemical behaviour of deoxycholic acid on multiwalled carbon nanotubes modified electrode,* Electroanalysis, 18(23), 2385-2388 (2006).
  56. Yilmaz U. T., Uzun D., Yilmaz H.: *A new method for rapid and sensitive determination of cholic acid in gallbladder bile using voltammetric techniques,* Microchemical Journal, 122, 159-163 (2015).
  57. Hulová D. *Využití elektrodových materiálů na bázi rtuti ke studiu elektrochemické redukce vybraných žlučových kyselin.* Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha (2015).
  58. Pišňová K.: *Studium elektrochemického chování kyseliny tauroursodeoxycholové na elektrodách na bázi rtuti.* Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha (2016).
  59. Patáková A.: *Elektrochemická redukce dehydrocholové a chenodeoxycholové kyseliny na stacionárních rtuťových a amalgámových elektrodách.* Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha (2016).
  60. Rákosníková Š.: *Studium elektrochemické redukce kyseliny deoxycholové a ursodeoxycholové na rtuťové visící kapkové elektrodě.* Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha (2014).

61. Patáková A.: *Studium elektrochemické redukce kyseliny chenodeoxycholové na stacionárních elektrodách na bázi rtuti*. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha (2013).
62. Campanella L.; Sorrentino L.; Tomassetti M.: *Cholate Liquid Membrane Ion-selective electrode for drug analysis*. *Analyst* 108, 1490 – 1494 (1983).
63. Barek J.; Opekar F.; Štulík K.; *Elektroanalytická chemie*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, Praha (2005).
64. Vyskočil V.; Barek J.; *Mercury electrodes – Possibilities and limitations in environmental electroanalysis*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 39, 173 – 188 (2009).
65. Barek J.; Fogg A. G.; Muck A.; Zima J.: *Polarography and voltammetry at mercury electrodes*. *Critical reviews in analytical chemistry* 31, 291 – 309 (2001).
66. Ross J. W., De Mars R. D., Shain I.: *Analytical applications of hanging mercury drop electrode*. *Analytical Chemistry* 28, 1768–1771 (1956).
67. Paleček, E.: *Adsorptive transfer stripping voltammetry: Determination of nanogram quantities of DNA immobilized at the electrode surface*. *Analytical Biochemistry*, 170(2), 421–431 (1988).
68. Fojt L., Doneux T., Fojta M.: *Effects of halide anions on adsorption and 2D condensation of 5-fluorocytosine at hanging mercury drop electrode*. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 821, 121–125 (2018).
69. Fojt L., Fojta M.: *Adsorption and 2D condensation of 5-nitrocytosine at the hanging mercury drop electrode*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 847 (2019).
70. Fojt L., Doneux Th., Vetterl V.: *Two-dimensional condensation of 5-fluorocytosine at the mercury electrode*. *Electrochimica Acta*, 73, 141-144 (2012).
71. Fojt L., Vetterl V., Doneux T.: *Two-dimensional condensation of nucleobases: a comparative study of halogen derivatives of cytosine*. *Collections of Czechoslovak Chemical Communications*, 74, 1611-1622 (2009).
72. Bard A.J., Faulkner L.R.: *Electrochemical methods. Fundamentals and Applications*. Second edition. John Wiley & Sons, Inc., USA (2001).

73. Bard A.J., Faulkner L.R.: *Elektrochemical methods, fundamentals and applications*, John Wiley & Sons, Inc., USA (1980).
74. Delahay P.: *Double layer and electrode kinetics*, Wiley-Interscience, New York (1965).
75. Compton R. G., Banks C. E.: Cyclic voltammetry: Coupled homogeneous kinetics and adsorption. In: *Understanding voltammetry*, 2nd edition. Imperial College Press, London 278 – 283, (2011).
76. Fojt L., Doneux Th., Vetterl V.: *Adsorption and two-dimensional condensation of of 5-methylcytosine*. *Bioelectrochemistry*, 75, 89-94 (2009).