

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Karolína Petráňová

VÝVOJ VOLTAMETRICKÝCH METOD PRO DETEKCI ŽLUČOVÝCH KYSELIN A JEJICH KONJUGÁTŮ

Development of voltammetric methods for detection of bile acids and
their conjugates

Diplomová práce

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

Praha 2023

Prohlášení

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

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

V Praze dne

Tato práce byla finančně podpořena granty Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt GAUK 362621) a Grantové agentury České republiky (projekt GAČR 19-112685).

Poděkování

Zde bych ráda poděkovala mé školitelce doc. RNDr. Karolíně Schwarzové, Ph.D. za její ochotu, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc během vypracovávání této práce. Zároveň bych také ráda poděkovala RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. za ochotu vždy pomoci s jakýmkoliv problémem a jeho vstřícné rady. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, která mi byla oporou při studiu i sepisování této práce.

Abstrakt

Tato práce se věnuje studiu elektrochemických vlastností žlučových kyselin a jejich konjugátů. Konkrétně bylo pracováno s kyselinou cholovou, kyselinou chenodeoxycholovou, kyselinou taurocholovou, kyselinou taurochenodeoxycholovou, kyselinou glykocholovou a kyselinou glykochenodeoxycholovou. Měření probíhala na borem dopované diamantové elektrodě v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé, s obsahem vody v roztoku 0,55 % metodou cyklické voltametrie.

Aby byly žlučové kyseliny elektrochemicky aktivní, je třeba nejprve provést jejich dehydrataci, která probíhá v reakci s kyselinou chloristou. Tato reakce vyžaduje poměrně dlouhý čas, proto byla urychlena zahříváním sloučenin ve vodní lázni.

Cílem této práce bylo zjištění podmínek, za kterých lze detekovat vzniklé dehydratační produkty žlučových kyselin. Byl zjištěn obsah vody, který je možný přidat do roztoku po dehydrataci, aby byl voltametrický signál stále stabilní. Dále bylo zjištěno, že voltametrické stanovení lze provést i v pH, které není extrémně kyselé jako to, ve kterém se provádí dehydratace. Na závěr byly sestaveny kalibrační závislosti.

Klíčová slova

Borem dopovaná diamantová elektroda, dehydratace, konjugáty žlučových kyselin, oxidace, voltametrie, žlučové kyseliny

Abstract

The aim of this thesis is to study the electrochemical properties of bile acids and their conjugates. Specifically, cholic acid, chenodeoxycholic acid, taurocholic acid, taurochenodeoxycholic acid, glycocholic acid, and glycochenodeoxycholic acid were studied. The measurements were carried out on a boron-doped diamond electrode in an environment of acetonitrile and perchloric acid, with a water content of 0.55% in the solution by method of cyclic voltammetry.

In order for bile acids to be electrochemically active, they must first be dehydrated, which takes place in a reaction with perchloric acid. This reaction requires a relatively long time, so it was accelerated by heating the compounds.

The goal of this work was to determine the conditions under which the dehydration products of bile acids can be detected. The water content that can be added to the solution after dehydration to keep the voltammetric signal stable was determined. Furthermore, it was found that the voltammetric determination can be carried out even at a pH that is not extremely acidic in which is the the dehydration carried out. Finally, calibration dependencies were compiled.

Key words

Boron doped diamond electrode, bile acids, conjugates of bile acids, dehydration, oxidation, voltammetry

Obsah

1	ÚVOD.....	10
1.1	Cíl diplomové práce.....	11
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	12
2.1	Žlučové kyseliny.....	12
2.1.1	Struktura žlučových kyselin.....	13
2.1.2	Vlastnosti žlučových kyselin.....	14
2.1.3	Biosyntéza žlučových kyselin.....	17
2.1.4	Význam žlučových kyselin.....	19
2.1.5	Studované žlučové kyseliny.....	19
2.2	Metody stanovení žlučových kyselin.....	21
2.2.1	Enzymatické metody.....	22
2.2.2	Chromatografické metody.....	22
2.2.3	Kapilární elektroforéza.....	24
2.3	Borem dopovaná diamantová elektroda.....	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	26
3.1	Používané chemikálie.....	26
3.2	Používané přístroje a zařízení.....	26
3.3	Studované látky.....	26
3.4	Metody a postup měření, zpracování dat.....	27
3.4.1	Elektrochemické měření.....	27
3.4.2	Dehydratace žlučových kyselin.....	28
3.4.3	Příprava pufrů.....	28
3.4.4	Zpracování a vyhodnocení dat.....	28
4	VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUSE.....	29
4.1	Charakterizace BDD elektrody.....	29

4.2	Časový průběh dehydratace a elektrochemické oxidace žlučových kyselin a jejich konjugátů.....	30
4.3	Vliv zahřívání měřeného roztoku na voltametrickou odezvu.....	34
4.4	Závislost anodické odezvy na obsahu vody v základním elektrolytu.....	38
4.5	Změny pH roztoku.....	41
4.6	Kalibrace.....	44
5	ZÁVĚR.....	47
6	Použitá literatura.....	49

Seznam uvedených zkratek a symbolů

BDD	Boron doped diamond	Borem dopovaný diamant
c	Molar concentration	Molární koncentrace [mol dm^{-3}]
CA	Cholic acid	Kyselina cholová
CDCA	Chenodeoxycholic acid	Kyselina chenodeoxycholová
CMC	Critical micelle concentration	Kritická micelární koncentrace
DPV	Differential pulse voltammetry	Diferenční pulsní voltametrie
E	Potential	Potenciál [V]
E_p	Peak potential	Potenciál píku [V]
GC	Gas chromatography	Plynová chromatografie
GCA	Glycocholic acid	Kyselina glykocholová
GCDC	Glycochenodeoxycholic acid	Kyselina glykochenodeoxycholová
A		
HPLC	High-performance liquid chromatography	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I	Current	Proud [μA]
I_p	Peak current	Proud píku [μA]
LOD	Limit of detection	Mez detekce
LOQ	Limit of quantitation	Mez stanovitelnosti

MS	Mass spectrometry	Hmotnostní spektrometrie
PEK	Polyetherketone	Polyetherketon
TCA	Taurocholic acid	Taurocholová kyselina
TCDCA	Taurochenodeoxycholic acid	Kyselina taurochenodeoxycholová
TLC	Thin layer chromatography	Tenkvrstevná chromatografie

1 ÚVOD

Žlučové kyseliny mají v lidském těle mnoho nezastupitelných funkcí, podílejí se na trávení lipidů, pomáhají udržovat homeostázu cholesterolu, podílejí se na degradaci proteinů a slouží i jako signální molekuly [1]. Podílí se také na metabolismu cholesterolu, kde napomáhají udržet jeho homeostázu [2].

Jejich stanovení je častým předmětem výzkumů posledních let. Je kladen důraz na vývoj metod, které by byly využitelné v klinické praxi, jelikož žlučové kyseliny jsou významnými markery zejména onemocnění jater [3]. Cílem je vývoj metody, která by byla rychlá, cenově dostupná a zároveň i dostatečně specifická a citlivá. Žlučové kyseliny nachází uplatnění ale i v dalších oborech. Přímou žlučové kyseliny se využívají při léčbě vrozených metabolických vad tvorby žluči, nebo jako cholagoga a choleretika – tedy léčiva podporující tvorbu, uvolňování a vylučování žluči. Je možné je využít také při léčbě žlučových kamenů. Žlučové kyseliny mají také velký potenciál být prekurzorem pro mnohé nové látky. Existují studie, které potvrzují, že ze žlučových kyselin lze syntetizovat antibiotika, protinádorová léčiva, nebo například molekulární senzory [1].

Klasické metody analýzy, které se v současné době běžně užívají jsou obvykle buďto málo citlivé, nebo velmi časově a finančně náročné. Proto je kladen důraz na vývoj nových metod a elektrochemické metody, které jsou základem této práce, mohou mít potenciál pro širší využití v praxi [2].

Obecně je známo, že žlučové kyseliny se špatně detekují – jejich molekuly neobsahují chromofory, ani nejsou elektrochemicky aktivní, bez předchozí aktivace, nejsou těkavé pro stanovení pomocí plynové chromatografie [4].

Detekce žlučových kyselin v této práci je založena na sledování elektrochemické oxidace po předchozí dehydrataci v prostředí acetonitril – kyselina chloristá. Dehydratací vzniká produkt, který je náchylnější k elektrochemické oxidaci a díky tomu je možné následně pozorovat odezvu v kladných potenciálech.

1.1 Cíl diplomové práce

Hlavním cílem této diplomové práce je popis elektrochemických vlastností vybraných žlučových kyselin za použití borem dopované diamantové elektrody v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé.

V literatuře již bylo popsáno chování kyseliny cholové a chenodeoxycholové ve zmiňovaném prostředí na dané elektrodě [5, 6]. Hlavním cílem této práce bylo studium elektrochemického chování analytů a jeho porovnání mezi sebou.

Konkrétním cílem bylo proměřit časové závislosti oxidace studovaných žlučových kyselin v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé. Nejprve byla prováděna dehydratace žlučových kyselin a jejich konjugátů a následně byla prováděna jejich oxidace.

Experimenty byly zaměřeny na optimalizaci podmínek pro dehydratační krok reakce, jejichž cílem bylo urychlení reakce. Následně byly studovány podmínky, za kterých lze detekovat vzniklé produkty dehydratace. Konkrétně se jednalo o množství vody, přítomné v základním elektrolytu a pH. Posledním z cílů této práce bylo proměření jednotlivých kalibračních závislostí a určení základních charakteristik metody.

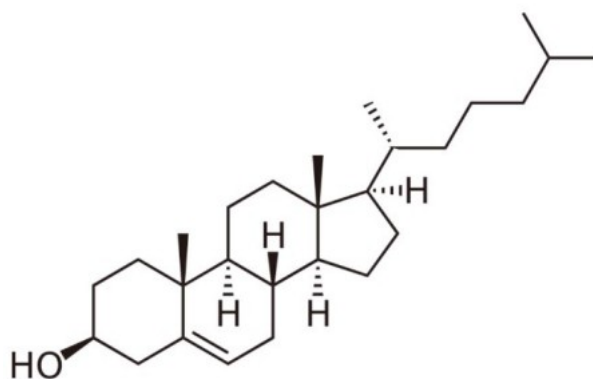
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny jsou organické látky, které jsou koncovým metabolitem v metabolismu cholesterolu (struktura viz. obr. 1). Jejich chemická struktura je velmi rozmanitá díky množství biochemických drah, ve kterých figurují, a při kterých mohou vznikat [3]. Jsou to steroidní molekuly s amfifilním charakterem [7]. Jejich názvosloví je složité, jelikož vznikalo výrazně dříve, než byla známa jejich struktura. První žlučové kyseliny byly izolovány ze žluči na počátku 19. století, kdy nebylo známo téměř nic o jejich biochemii a struktuře. Žlučové kyseliny se proto pojmenovávaly podle organismů, z nichž byly izolovány [3].

Žlučové kyseliny, které jsou syntetizovány z cholesterolu v hepatocytech, se nazývají primární žlučové kyseliny [3]. Mezi primární žlučové kyseliny člověka se řadí kyselina cholová, kyselina chenodeoxycholová a jejich konjugáty s taurinem a glycinem [8]. Sekundární žlučové kyseliny vznikají z primárních modifikacemi bakteriemi [3]. U člověka se nejčastěji vyskytuje kyselina litholová a deoxycholová [8]. Primární žlučové kyseliny jsou následně v játrech konjugovány s taurinem, nebo glycinem [9]. Tyto konjugáty jsou často označovány jako žlučové soli, jelikož v důsledku nízkého pKa a úplné ionizace se vyskytují převážně jako anionty [8].

Převážná většina žlučových kyselin podléhá po sekreci do střeva reabsorpci a vrací se do jater, kde jsou znovu vycytávány. Tento proces se nazývá enterohepatální cyklus [9].

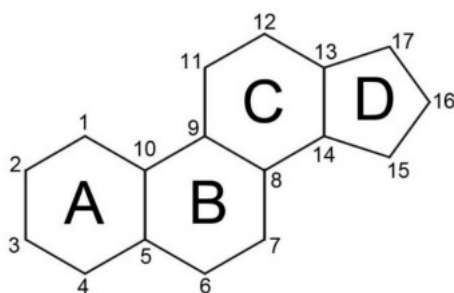


Obr. 1: Struktura cholesterolu (převzato a upraveno z [7])

2.1.1 Struktura žlučových kyselin

Základem struktury žlučových kyselin je steroidní jádro (obr. 2.) složené ze tří nasycených šestiuhlíkových kruhů (značení A, B, C) a jednoho pětiuhlíkatého (D). Na toto steroidní jádro je navázán krátký alifatický postranní řetězec. U člověka je jádro žlučových kyselin zakřivené, díky cis-konfiguraci kruhu A a B [10]. Každá žlučová kyselina obsahuje na posledním uhlíku (C_{17}) alifatického postranního řetězce karboxylovou skupinu. Zároveň jsou na tomto řetězci přítomné hydroxylové skupiny, jejichž poloha a množství je charakteristická vždy pro konkrétní žlučovou kyselinu. Společným znakem všech žlučových kyselin je umístění hydroxylové skupiny v poloze C_3 [11].

Žlučové kyseliny se ve vodním prostředí spojují a vytváří jednoduché micely. Mají však schopnost solubilizovat lipidové dvojvrstvy a vytvářet smíšené micely, čehož je využíváno při trávení tuků [7].



Obr. 2: Struktura steroidního jádra včetně daného číslování a značení.

Od prvního objevu krystalických žlučových kyselin probíhá výzkum jejich struktury. Zejména v odvětví organické chemie bylo provedeno mnoho výzkumů, které objasnily základní konstituci žlučových kyselin, ale například i jejich stereochemii [1].

Žlučové kyseliny se dělí do dvou základních skupin, a to C_{27} a C_{24} , podle celkového počtu atomů uhlíku ve struktuře. C_{27} žlučové kyseliny mají postranní řetězec o délce C_8 a C_{24} žlučové kyseliny obsahují postranní řetězec C_5 . Do těchto skupin patří převážná většina známých žlučových kyselin vyskytujících se u obratlovců. U savců převažují žlučové kyseliny s 24 uhlíky [3].

2.1.2 Vlastnosti žlučových kyselin

Jak již bylo řečeno, žlučové kyseliny jsou amfifilní molekuly. Mají dvě části, které jsou rozdílné – označují se α a β . Část molekuly α je hydrofilnější a obsahuje hydroxylové skupiny, β část molekuly je hydrofobnější a nemá hydrofilní substituenty [12].

Rozpustnost žlučových kyselin ve vodě je dána jejich strukturou, a to jak strukturou jádra a případných substituentů na něm, tak strukturou postranního řetězce. Zároveň může být také ovlivněna prostorovou orientací substituentů. Dalším zásadním faktorem rozpustnosti je pH roztoku a pK_a žlučových kyselin [13]. Pokud bychom brali v potaz žlučové kyseliny studované v této práci, jejich rozpustnost ve vodě se bude poměrně lišit – záleží na struktuře molekul a jejich formě. Obecně lze ale říci, že jejich rozpustnost ve vodě je malá. Se zvyšujícím se pH roste jejich rozpustnost, dokud není dosaženo kritické micelární koncentrace. Při dosažení kritické micelární koncentrace se rozpustnost žlučových kyselin stává v podstatě neomezenou [14]. Hodnoty rozpustnosti jednotlivých žlučových kyselin ve vodě, jejich kritická micelární koncentrace a hodnoty pK_a jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Hodnoty rozpustnosti ve vodě, jejich kritické micelární koncentrace (CMC) a pK_a kyseliny cholové (CA), chenodeoxycholové (CDCA), glykocholové (GCA), glykochenodeoxycholové (GCDCA), taurocholové (TCA) a taurochenodeoxycholové (TCDCA). Zdroj [15].

Žlučová kyselina	Rozpustnost ve vodě [$\mu\text{mol dm}^{-3}$]	CMC ve vodě [mmol dm^{-3}]	pK_a
CA	273	13	5,2
CDCA	27	9	6,2
GCA	32	12	3,8
GCDCA	7	6	4,3
TCA	-	10	<2
TCDCA	-	7	<2

Elektrochemické vlastnosti žlučových kyselin a metody detekce

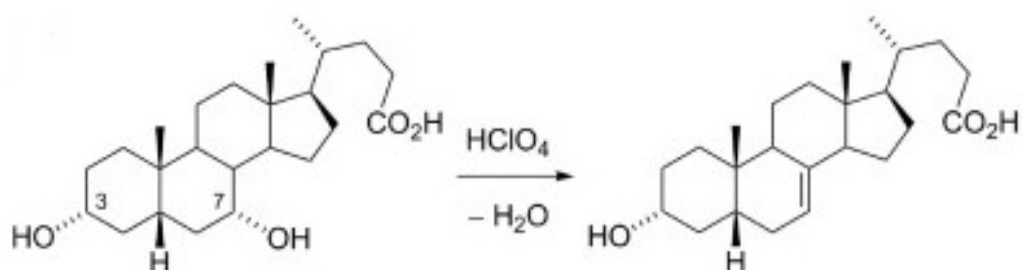
Základní struktura žlučových kyselin, která je tvořena steroidním jádrem, není sama o sobě elektrochemicky aktivní. Celkově lze říci, že elektrochemické vlastnosti celé skupiny steroidů závisí na funkčních skupinách jednotlivých sloučenin, které jsou navázány na steroidní jádro a na přítomnosti dvojných vazeb v jádru [16].

I kvůli této skutečnosti neexistuje velké množství pramenů, zabývajících se elektrochemickou analýzou žlučových kyselin. V článku od autorů Nesměrák, Pecková jsou shrnuty poznatky do roku 2012 [17]. Další posuny a poznatky shrnul ve své práci Klouda et al. [16].

Díky struktuře žlučových kyselin může probíhat jejich oxidace i redukce. O redukci žlučových kyselin bylo do současnosti publikováno jen málo. Lze nalézt článek o stanovení žlučových kyselin na klasické kapající rtuťové elektrodě, kde byly stanovovány žlučové kyseliny v léčivých přípravcích [18]. Další práce zabývající se redukcí žlučových kyselin byly provedeny na Přírodovědecké fakultě univerzity Karlovy v Praze, kde byly na toto téma vypracovávány bakalářské a diplomové práce. Konkrétně Kristýna Jelšíková se zabývala vývojem elektroanalytických metod pro detekci žlučových kyselin obsahujících 7 α hydroxylovou skupinu [6], redukcí žlučových kyselin na rtuťových elektrodách se zabývaly další kvalifikační práce [19, 20, 21, 22, 23]. Elektrochemická redukce žlučových kyselin je charakterizována píkem, který se objevuje v rozmezí potenciálů -1150 mV až -350 mV [18].

Oxidace žlučových kyselin v potenciálových oknech běžných elektrodoých materiálů není možná vzhledem k tomu, že žlučové kyseliny mají nasycené steroidní jádro a nemají snadno oxidovatelné funkční skupiny. Celkově bylo této problematice věnováno teprve málo článků a výzkumů. V laboratoři Univerzity Karlovy však probíhají výzkumy, které se touto problematikou zabývají. Podařilo se prokázat možnosti oxidace žlučových kyselin v nevodném prostředí (acetonitril-chloristan sodný) a v prostředí acetonitril-kyselina chloristá, kdy je v roztoku přítomno přibližně 0,55 % vody. Bylo zjištěno, že v prostředí acetonitril-kyselina chloristá poskytuje kyselina cholová a chenodeoxycholová na borem dopované diamantové elektrodě (BDD) dobře vyvinutou anodickou odezvu v oblasti kladných potenciálů, jejichž hodnota je okolo $+1,2$ V oproti Ag/AgNO₃ [2, 24]. Kyselina chloristá v acetonitrilu aktivuje primární žlučové kyseliny. Acetonitril zde slouží jako podpůrný elektrolyt a zároveň jako dehydratační činidlo. Primární žlučové kyseliny v tomto prostředí procházejí dehydratací a výsledná molekula pak může být snadno

oxidována na elektrodách, jako je BDD, platina nebo skelný uhlík. Oxidace je umožněna díky zavedení dvojné vazby do molekuly při dehydrataci. Předpokládaný průběh reakce je uveden na obr. 3. Tato chemická reakce probíhá tak, aby bylo možné zaznamenat následný voltametrický signál, pouze u primárních žlučových kyselin. A to díky přítomnosti 7 α -hydroxylové skupině, která je pro vznik nenasyceného analogu primárních žlučových kyselin nezbytná [2].



Obr. 3: Předpokládaný průběh dehydratačního kroku reakce kyseliny chenodeoxycholové s kyselinou chloristou. Převzato a upraveno dle [24].

Elektrochemické metody nejsou v běžné praxi pro studii žlučových kyselin příliš využívány. Obecně lze tyto metody rozdělit na přímé a nepřímé [2].

Jednou z vyvinutých metod je nepřímá elektrochemická detekce pomocí tištěné uhlíkové elektrody. Žlučové kyseliny se v této metodě převádějí na 3-ketosteroidy pomocí 3- α -hydroxysteroiddehydrogenázy v přítomnosti NADH. Dochází k redukcí NAD⁺ na NADH. NADH poté může být oxidováno na povrchu elektrody, vzniklý signál lze detekovat a následně spočítat celkovou koncentraci žlučových kyselin ve vzorku. Tato metoda je vhodnou alternativou k enzymatickým testům. Oproti nim je levnější, citlivější, šetří reagentie a její přesnost i výtěžnost je dostačující pro využití v klinické praxi [25].

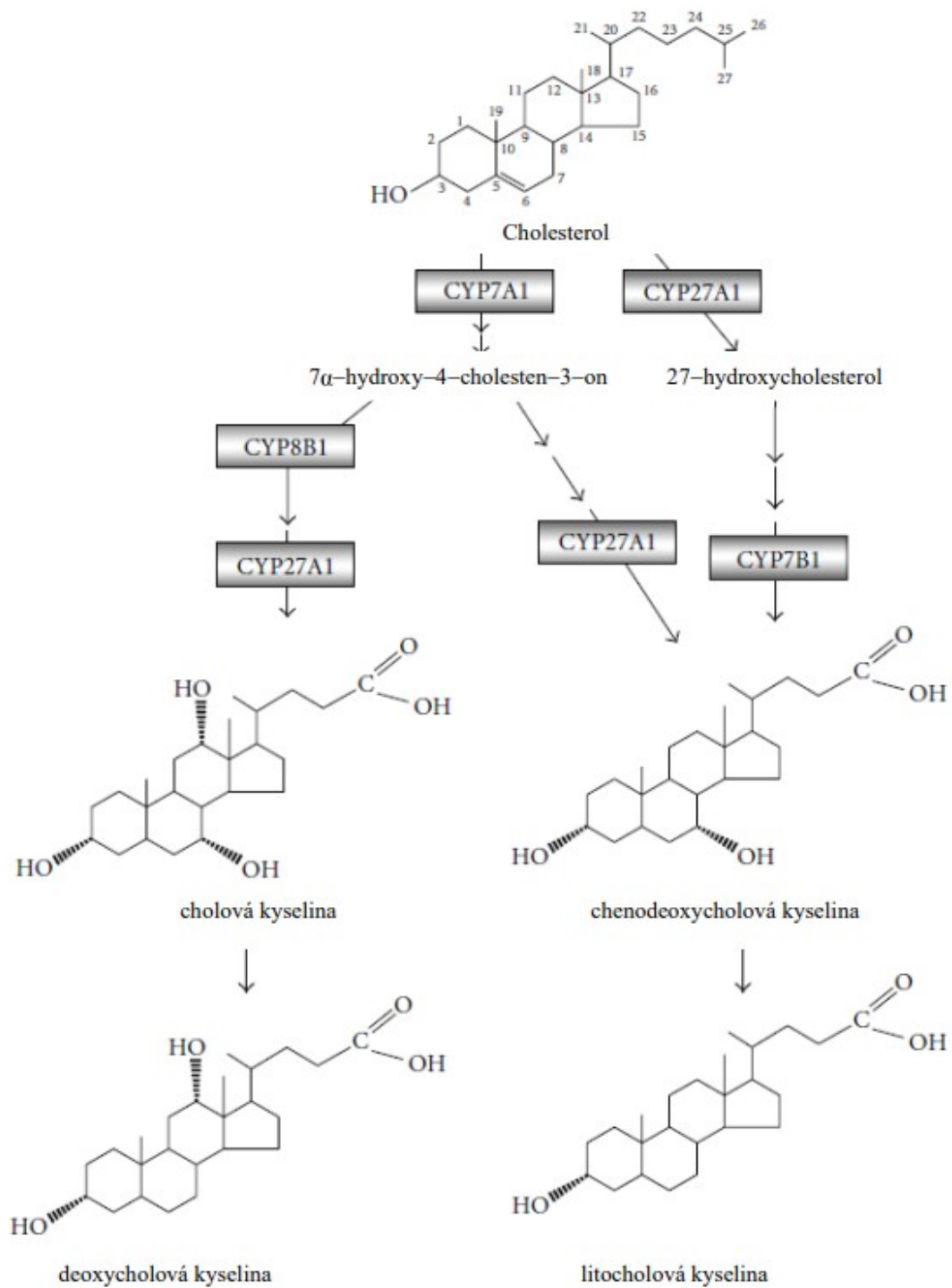
Žlučové kyseliny, jakožto alifatické alkoholy, jsou ve voltametrické praxi prakticky elektrochemicky neaktivní. V nedávné studii však bylo zjištěno, že žlučové kyseliny lze chemicky aktivovat *in situ* použitím 0,1 M HClO₄ v acetonitrilu, které slouží jako základní elektrolyt a také jako dehydratační činidlo. Takto aktivovaná molekula může následně poměrně snadno podstoupit elektrochemickou oxidaci na elektrodách jako je platinová, borem dopovaná, nebo ze skelného uhlíku. K této oxidaci dochází při potenciálu přibližně +1,2 V oproti Ag/AgNO₃ v acetonitrilu. Oxidace je usnadněna zavedením dvojné vazby do

molekuly počáteční dehydratací. Bylo zjištěno, že hlavní primární žlučové kyseliny (CA a CDCA), mohou být za těchto podmínek oxidovány, a to díky přítomnosti 7 α -hydroxylové skupiny, která se nachází v antiplanární poloze k axiálnímu 8 β -protonu – to činí molekulu velice náchylnou k dehydrataci. Sekundární žlučové kyseliny jsou za stejných podmínek elektrochemicky neaktivní z důvodu rozdílné struktury [2].

2.1.3 Biosyntéza žlučových kyselin

Žlučové kyseliny se vyskytují zejména v játrech, žlučových cestách a v tenkém a tlustém střevě. Zásadní funkcí žlučových kyselin je trávení lipidů a podpora vylučování cholesterolu. Biosyntéza žlučových kyselin je jednou ze tří regulačních cest v udržení homeostázy cholesterolu a hrají zde tedy nezastupitelnou roli [2]. Krom toho ale také denaturují proteiny v potravě, čímž zvyšují rychlost jejich štěpení pankreatickými enzymy. Mají také antimikrobiální účinky [3]. Žlučové kyseliny také slouží jako signální molekuly [4], ovlivňují mnoho metabolických drah, včetně vlastní biosyntézy, nebo enterohepatálního oběhu [1].

Jak již bylo řečeno, žlučové kyseliny vznikají metabolismem cholesterolu. Cholesterol je steroidní látka, která se účastní mnoha dalších biochemických cest. Podílí se na fluiditě biologických membrán, jejich stavbě, je substrátem syntézy mnoha biologicky významných látek. Také je regulátorem genové transkripce, degradace proteinů, enzymových aktivit a bývá zapojený do programované buněčné smrti. Z toho plyne, že je pro lidský organismus nepostradatelný [26]. Vznik žlučových kyselin je jednou z možností degradace cholesterolu, která probíhá v játrech. Enzymy, které cholesterol metabolizují, jsou cytochromy P450 [27]. Existuje více možných cest přeměny cholesterolu na žlučové kyseliny. Dvě hlavní cesty se nazývají klasická (neutrální) a alternativní (kyselá) [28]. Při klasické cestě vzniku kyselin nejprve dochází k hydroxylaci cholesterolu v poloze 7 α [27]. Celkově je proces degradace cholesterolu velmi složitý, zahrnuje nejméně 17 enzymů a různých transportních proteinů [28]. Schéma metabolismu cholesterolu a jeho přeměny na primární a sekundární žlučové kyseliny je uvedeno na Obr. 4.



Obr. 4: Schéma metabolismu cholesterolu a biosyntézy žlučových kyselin. Převzato a upraveno dle [29].

2.1.4 Význam žlučových kyselin

Vzhledem k existenci mnohých poruch v biosyntéze žlučových kyselin má jejich stanovení význam v klinické praxi [2]. Může dojít k poruše sekrece žlučových kyselin, jejich reabsorpce, či jejich zpracování v tlustém střevě. Jejich stanovení je využíváno při diagnostice jaterních poruch, mají význam u pacientů s cukrovkou, či zánětlivým onemocněním střev [30]. Množství žlučových kyselin v séru je užitečným ukazatelem jak pro screening, tak pro diagnostiku onemocnění jater [25].

Krom významu v klinické praxi mají žlučové kyseliny své místo i ve farmakologii. Žlučové kyseliny, či jejich analogy mají terapeutický potenciál při léčbě jaterních onemocnění, nebo například i *diabetes mellitus*. Žlučové kyseliny se také podávají při vrozených metabolických chorobách, kdy může být snížena tvorba žlučových kyselin [1].

Žlučové kyseliny mohou být také využívány pro syntézu nových molekul. Provádějí se chemické modifikace žlučových kyselin, při kterých se využívá struktura steranového jádra, které má daná chirální centra a další možnosti vazby pro uhlíky. Byly provedeny studie, kdy se ze žlučových kyselin vyvinula antibiotika, léčiva protinádorové a antivirové terapie, nebo molekulární senzory [1].

2.1.5 Studované žlučové kyseliny

V této práci bylo studováno 6 žlučových kyselin – kyselina cholová (CA), kyselina chenodeoxycholová (CDCA), kyselina glykocholová (GCA), kyselina glykochenodeoxycholová (GCDCA), kyselina taurocholová (TCA) a kyselina taurochenodeoxycholová (TCDCA), jejich struktury jsou uvedeny na obr. 5.

U člověka tvoří přibližně 40 % všech žlučových kyselin kyselina cholová, dalších 40% kyselina chenodeoxycholová a 1–3 % konjugáty těchto kyselin s glycinem a taurinem [30].

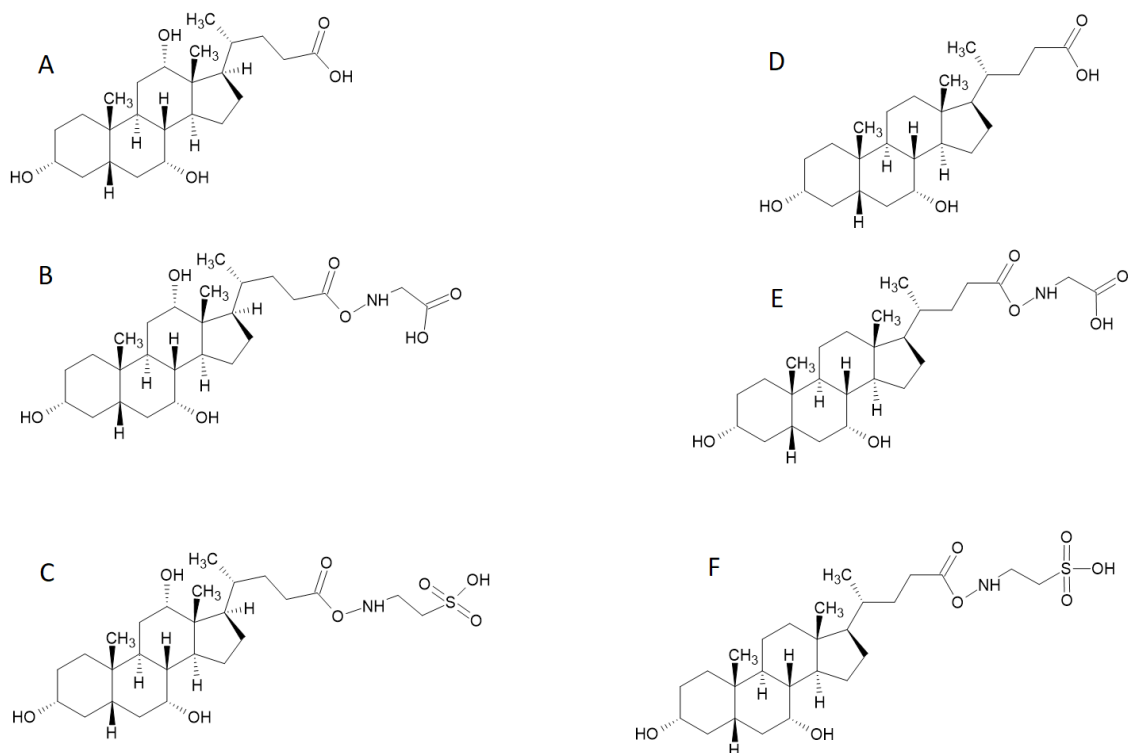
Cholová kyselina se terapeuticky využívá při defektu některého z enzymů tvorby žlučových kyselin [31]. V játrech je syntetizována z cholesterolu a následně je konjugována s taurinem, nebo glycinem. Je to látka nerozpustná ve vodě, ale rozpustná v ethanolu. V izolovaném stavu je to bílá krystalická látka [32].

Kyselina chenodeoxycholová je další primární žlučovou kyselinou. Syntetizována je také v játrech a vyskytuje se ve vysokých koncentracích ve žluči. Terapeuticky se využívá k rozpouštění cholesterolových žlučových kamenů. Její hlavní funkcí v těle

je rozpouštění cholesterolu, inhibice produkce cholesterolu v játrech a absorpce ve střevě. Stejně jako kyselina cholová je to bílá krystalická látka, ve vodě je poměrně obtížně rozpustná, její rozpustnost v alkoholu je vyšší [33].

Kyselina taurocholová je konjugát cholové kyseliny s taurinem. U savců se obvykle vyskytuje jako sodná sůl ve žluči. Je to nažloutlá krystalická sloučenina, podílející se na emulgaci tuků [34]. Dalším konjugátem kyseliny cholové je kyselina glykocholová. Stejně jako taurocholová kyselina je to krystalická látka, která se podílí na emulgaci tuků. Také se nejčastěji vyskytuje jako sodná sůl [35].

Kyselina taurochenodeoxycholová je konjugátem kyseliny chenodeoxycholové s taurinem. Obvykle se ve žluči vyskytuje jako sodná sůl. V těle působí jako detergent pro solubilizaci tuků. Ve farmakologii se používá jako cholagogum a choleretikum, tedy jako léčivo zvyšující tvorbu, uvolňování a vylučování žluči [36]. Kyselina glykochenodeoxycholová je konjugátem kyseliny chenodeoxycholové s glycinem, pro kterou platí stejné charakteristiky, jako jsou uvedeny u kyseliny taurochenodeoxycholové.



Obr. 5: Struktury žlučových kyselin. A - cholová kyselina, B – glykocholová kyselina, C – taurocholová kyselina, D - chenodeoxycholová kyselina, E – glykochenodeoxycholová kyseliny, F – taurochenodeoxycholová kyselina.

2.2 Metody stanovení žlučových kyselin

Vzhledem k tomu, že se žlučové kyseliny přirozeně vyskytují v širokém rozmezí koncentrací a obvykle v komplexních biologických matricích, jsou pro jejich stanovení potřeba pokročilé analytické metody. V klinických laboratořích jsou nejčastěji používané enzymatické metody, ale ty poskytují jen omezené informace o jednotlivých žlučových kyselinách. Mnohem více informací přináší pokročilé analytické metody, jako je plynová a kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetická rezonanční spektrometrie [4]. Zásadními vlastnostmi metod jsou vysoká selektivita a citlivost, tak aby bylo možné stanovovat i malé koncentrace a rozlišit velké množství izomerů přítomných ve vzorcích [37]. V klinické praxi je také zároveň kladen důraz na rychlost analýzy, proto metody, u nichž je nutná dlouhá příprava vzorků, nejsou optimální a je snaha o nalezení rychlejších metod [2].

2.2.1 Enzymatické metody

Enzymatické metody poskytují poměrně rychlé a jednoduché stanovení celkového obsahu žlučových kyselin. Právě proto patří k nejužívanějším metodám v klinických laboratořích. Nejjednodušším testem je měření fluorescence NADH generované 3 α -hydroxysteroid dehydrogenázou se žlučovými kyselinami v přítomnosti NAD⁺ [38].

Enzymatické metody jsou využitelné pro stanovení nejběžněji se vyskytujících žlučových kyselin, a to jak volných, tak jejich konjugátů s glycinem a taurinem ve žluči. Samotné analýze musí předcházet separace denaturovaných proteinů. Citlivost enzymového testu může být zvýšena použitím bioluminiscence a enzymu luciferázy [39].

2.2.2 Chromatografické metody

Protože jednotlivé žlučové kyseliny jsou klinicky významné a mají rozdílné fyziologické funkce, je potřeba selektivní a specifická metoda pro kvantifikaci žlučových kyselin [4].

Jednou z chromatografických metod, které je možné využít k rozlišení primárních a sekundárních žlučových kyselin a jejich glycinových a taurinových konjugátů je chromatografie na tenké vrstvě (TLC) [40]. Byla jednou z prvních metod, používaných pro separaci žlučových kyselin. V současné době se používá zejména ke sledování průběhu chemické přeměny žlučových kyselin [39]. Výhodná je zejména pro svůj relativně rychlý a levný postup. Lepších separací lze dosáhnout při použití dvourozměrné TLC separace [40].

Další vhodnou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která se při analýze žlučových kyselin využívá velmi často. Oproti dříve diskutovaným technikám poskytuje HPLC lepší citlivost i separaci analytů v komplexní matici. Zvolení konkrétní metody chromatografie, detektoru a kolon závisí na účelu analýzy a typu analyzovaného vzorku [4]. Například hlavní žlučové kyseliny v lidské žluči lze oddělit na koloně C18 s reverzní fází za méně než 30 minut [39]. Pokud jsou žlučové kyseliny ve vzorku v nižších koncentracích (nM) využívá se předkolonové derivatizace, což poskytuje zlepšení citlivosti a rozlišení detekce. Mez detekce této metody byla stanovena na hodnoty 6,1 10⁻² $\mu\text{mol dm}^{-3}$ a limit kvantifikace na 0,12 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Pro stanovení konjugovaných žlučových kyselin se používá iontová párová

chromatografie, což zlepšuje selektivitu [41].

Další významnou metodou v analýze žlučových kyselin je spojení chromatografických technik, zejména HPLC, s hmotnostní detekcí (MS). Vyznačují se vysokou citlivostí a širokými možnostmi využití [4]. Tandemová MS byla nejpoužívanější metodou pro analýzu žlučových kyselin v posledních dvaceti letech [37]. Nejčastěji využívané ionizační techniky jsou elektrosprejová, chemická ionizace za atmosférického tlaku a ionizace urychlenými atomy, ve spojení s hmotnostními analyzátory – iontovou pastí, průletovým analyzátorem nebo iontovou cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací. Použití hmotnostní spektrometrie s Fourierovou transformací s lineární iontovou pastí vedlo k identifikaci 17 žlučových kyselin, včetně jejich taurinových a glycinových konjugátů. Metoda vykazovala stonásobný lineární dynamický rozsah a mez kvantifikace se pohybovala mezi 10 a 50 pg [42].

Nejčastěji se v současnosti využívá chromatografie na reverzní fázi, která umožňuje volbu průtoků i rozměrů kolony. Důležitým faktorem je také volba pH mobilní fáze – to ovlivňuje jak samotnou chromatografickou separaci, tak ionizační vlastnosti žlučových kyselin. V současnosti je popsáno několik různých metod spojení HPLC a MS, které se využívají k analýze žlučových kyselin. Tyto metody lze použít pro identifikaci žlučových kyselin na základě jejich hmotnosti. Pokud chceme posuzovat strukturu a nemáme k dispozici referenční standardy, je vhodnější využít tandemovou MS využívající MS/MS fragmentační vzory. Konjugované a nekonjugované žlučové kyseliny totiž poskytují charakteristické fragmentační vzory v MS/MS [4].

Další možnou chromatografickou metodou je plynová chromatografie (GC), což je technika pro těkavé a polotěkavé sloučeniny v plynném stavu. Žlučové kyseliny jsou ale obvykle díky své struktuře málo těkavé a před GC je tedy potřeba provést derivatizační krok, aby bylo možné látky separovat a analyzovat. S rozvojem detekčních technik, jako je detekce elektronového záchytu, nebo plamenová ionizační detekce, se možnosti analýzy žlučových kyselin rozšířily a je možná jejich detekce i ve žluči, séru, nebo stolici. Ale stále je tato technika velice časově náročná a její využívání je omezené [43]. Časovou náročnost metody lze zlepšit použitím kapilárních kolon. Tím se zároveňlepší i rozlišení. Pro stanovení nízkých koncentrací látek se často kombinuje s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) [39]. Její význam byl však největší v minulém století. Účinnost separace je sice lepší než u HPLC-MS a poskytuje i více strukturních informací, ale samotné analýze předchází zdlouhavá příprava. Ta vyžaduje skupinovou frakcionaci, hydrolýzu konjugátů

a přípravu těkavých derivátů. GC-MS je tedy metodou vhodnou zejména pro nekonjugované žlučové kyseliny [37].

2.2.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je metoda založená na rozdílné elektroforetické mobilitě sloučenin v elektrickém poli. Výhodou metody je jednoduchost a rychlost analýzy a také vysoká účinnost. Nevýhodou však je, že mnoho molekul konjugovaných, nebo nekonjugovaných druhů žlučových kyselin má stejný náboj a téměř identickou velikost, což vede k tomu, že mají podobné elektroforetické mobility a separace je neuspokojivá. Lepší výsledky poskytuje micelární elektrokinetická kapilární chromatografie, ale stále je však jen vedlejší metodou v analýze žlučových kyselin, zejména kvůli své nízké citlivosti [37].

2.3 Borem dopovaná diamantová elektroda

V posledních letech jsou diamantové elektrody pro elektrochemické aplikace častým předmětem zkoumání. Je to zejména díky jejich širokému potenciálovému oknu, nízkému šumu pozadí, chemické inertnosti a mechanické odolnosti. Tyto vlastnosti má diamant díky svému uspořádání – sp^3 hybridizaci uhlíků a tetraedrické vazbě [44]. Přírodní diamant však nelze použít jako elektrodový materiál, jelikož se jedná o polovodič s velmi vysokým vlastním odporem. V borem dopovaném diamantu je, jak už z názvu vyplývá, začleněn bór. Protože bór má o jeden elektron méně než uhlík, a má malý atomový poloměr, je snadno začleněn do struktury diamantu, kde slouží jako akceptor náboje. Zvyšuje tedy vodivost a kinetiku přenosu elektronů v diamantu [45].

Díky všestrannosti BDD elektrod je možné s jejich pomocí detekovat velké množství různých analytů. A to s nízkými detekčními limity, velkou přesností a stabilitou. Další výhodou, oproti jiným elektrodám je stabilizace proudu pozadí, které je velice rychlé. Široké využití BDD elektrod pramení z toho, že mnohé analyty jsou oxidovány až při vysokých pozitivních potenciálech, které na běžně užívaných elektrodách mohou být mimo potenciálové okno elektrody [44]. U BDD elektrod bývá potenciálové okno až do hodnot kolem +3,5 V [46].

Obecně je potenciálové okno vymezeno limitními reakcemi, které na elektrodě

probíhají. U BDD elektrody jsou to katodický vývoj (únik) vodíku a anodický vývoj kyslíku. K těmto dějům dochází z důvodu absorpce vody na povrch elektrody a její následné elektrolýzy [47].

Nejčastěji používané materiály pro elektrody v elektrochemii jsou platina, zlato a různé formy sp^2 -vázaného uhlíku. Tyto materiály jsou ale náchylné k pasivaci povrchu elektrody, což následně zvyšuje kapacitní proud (proud pozadí), čímž se snižuje poměr signálu analytu k šumu a tím se snižuje i reprodukovatelnost stanovení. U BDD elektrod ke pasivaci povrchu prakticky nedochází [45].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Používané chemikálie

- Acetonitril ($\geq 99,9\%$, Honeywell, USA)
- Kyselina chloristá (70 – 72 %, Penta, Chrudim, ČR)
- Ferrokyanid draselný (Lachema, Brno, ČR)
- Leštící směs – roztok aluminy (Elektrochemické detektory, Turnov, ČR) o blíže nespecifikované velikosti částic v deionizované vodě
- Kyselina fosforečná (85 %, Penta, Chrudim, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan sodný (Chemapol, Praha, ČR)
- Kyselina octová (99 %, Penta, Chrudim ČR)
- Octan sodný trihydrát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydroxid sodný (99 %, Mach chemikálie, Slezská Ostrava, ČR)
- Dusičnan stříbrný (Penta, Chrudim, ČR)
- Chloristan sodný (Penta, Chrudim, ČR)

3.2 Používané přístroje a zařízení

- Eco-Tribo Polarograf (Eco-Trend Plus, Praha, Česká republika)
- Borem dopovaná diamantová elektroda o průměru 3 mm a ploše 7,1 mm² (BioLogic, Seyssinnet – Pariset, Francie)
- Platinová elektroda (typ ETP-CZ – P1101)
- Pleskovova bezvodá elektroda (stříbrný drátek ponořený v roztoku 0,01 mol dm⁻³ AgNO₃ a 1 mol dm⁻³ NaClO₄ v acetonitrilu)
- Váhy Nimbus (Adam Equipment, Oxford, USA)
- Magnetické míchadlo WiseStir MSH-20D (Wisd Laboratory Equipment, Grafstal, Švýcarsko)
- Ultrazvuková lázeň digitální ELMASONIC řady P (Tovatech, Plano, USA)

3.3 Studované látky

Studované látky byly kyselina cholová ($\geq 98\%$), kyselina chenodeoxycholová ($\geq 97\%$),

taurocholát sodný ($\geq 97\%$), glykocholát sodný ($\geq 97\%$), taurochenodeoxycholát sodný ($\geq 95\%$), glykochenodeoxycholát sodný ($\geq 97\%$), všechny od firmy Sigma – Aldrich (Německo). Veškeré zásobní roztoky byly připraveny v acetonitrilu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

3.4 Metody a postup měření, zpracování dat

3.4.1 Elektrochemické měření

Používanou metodou měření byla cyklická voltametrie, pro kterou byl používán potenciostat Eco-Tribo polarograf se softwarem MultiElChem 3.2.1.. Výjimkou jsou koncentrační závislosti, které byly měřeny metodou diferenční pulsní voltametrie (DPV).

Veškerá měření byla prováděna v tříelektrodevém zapojení. Pracovní, borem dopovaná diamantová elektroda, tvořená BDD diskem vloženým do elektrodového těla, které je z PEK (polyetherketonu), byla před každým měřením leštěna po dobu 15 s pomocí suspenze aluminu v deionizované vodě na leštící podložce. Jako referenční elektroda byla použita Pleskovova nevodná elektroda (stříbrný drátek ponořený v roztoku $0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3$ a $1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$ v acetonitrilu) a jako pomocná platinová elektroda.

Základním elektrolytem pro měření byla $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselina chloristá v acetonitrilu, pokud není uvedeno jinak. Tento roztok obsahuje $0,55\%$ vody (určeno titrací podle Karla Fishera [2]), která pochází ze zásobního roztoku koncentrované kyseliny chloristé a acetonitrilu, který nebyl pro přípravu roztoků vysušován. Studované roztoky žlučových kyselin a jejich konjugátů byly měřeny při koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Rychlost polarizace při cyklické voltametii byla 100 mV s^{-1} .

Měření byla prováděna ve třech cyklech, pokud není uvedeno jinak. Pro prezentaci výsledků jsou využívány vždy první cykly z daného měření. Před samotnými měřeními byl vždy proměřen základní elektrolyt. Mezi jednotlivými měřeními byla pracovní BDD elektroda vždy přeštěna. V grafech jsou pro přehlednost uváděny pouze dopředné skeny, z důvodu přehlednosti grafů.

Při vyhodnocení křivek byla vždy odečtena hodnota signálu základního elektrolytu při určitém potenciálu od hodnoty signálu měřeného roztoku žlučové kyseliny nebo jejich konjugátu.

3.4.2 Dehydratace žlučových kyselin

V první fázi měření byla dehydratace žlučových kyselin a jejich konjugátů prováděna samovolně za laboratorní teploty v prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu. Dehydratační krok je nezbytný, aby bylo možné žlučové kyseliny následně oxidovat a získat tak voltametrickou odezvu. Předpokládaný průběh reakce je uveden v teoretické části práce na obr. 3 v kapitole 2.1.2.1 Elektrochemické vlastnosti žlučových kyselin a metody detekce.

Pro zkrácení dehydratace bylo následně prováděno zahřívání roztoku sledované žlučové kyseliny v prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu. Zahřívání bylo prováděno ve vodní lázni. Odměrná baňka s připraveným roztokem byla vložena do vodní lázně o teplotě $50 \text{ }^\circ\text{C}$, která byla udržována. Po předem stanoveném časovém úseku bylo zahřívání ukončeno a analyzovaný roztok ihned ochlazen ve studené vodě, aby došlo k okamžitému zpomalení až zastavení probíhajících chemických reakcí. Následně bylo provedeno voltametrické měření.

3.4.3 Příprava pufrů

Na měření produktů dehydratační reakce žlučových kyselin v prostředích o různých pH byly připraveny tři pufrы o různých pH tak, aby pokryly celou škálu pH.

Připraven byl octanový pufr o $\text{pH} = 5,0$ a fosfátový pufr o $\text{pH} = 2$ a $\text{pH} = 7$. Koncentrace pro všechny pufrы byla zvolena stejná, a to $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Octanový pufr byl připraven odvážením přesného množství trihydrátu octanu sodného a přesného objemu kyseliny octové. Tato množství byla zjištěna výpočtem. Fosfátový pufr byl obdobně připraven z dihydrogenfosforečnanu sodného a kyseliny fosforečné pro $\text{pH} = 2,0$ a z dihydrogenfosforečnanu sodného a hydrogenfosforečnanu disodného pro $\text{pH} = 7,0$.

3.4.4 Zpracování a vyhodnocení dat

Pro vyhodnocení naměřených křivek byly využity následující programy: MultiElChem (Polaro-Sensors, ČR), OriginPro 2016 (OriginLab Corporation, USA), Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA).

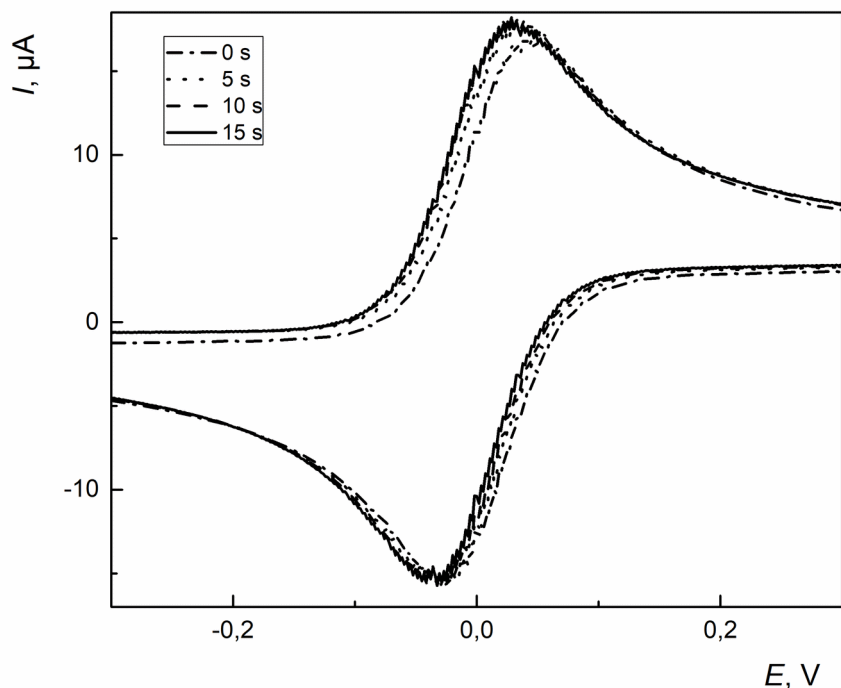
4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUSE

V této kapitole jsou shrnuty dosažené výsledky práce, zejména elektrochemických vlastností vybraných žlučových kyselin a jejich konjugátů v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé. Měřeny byly kyselina cholová, kyselina chenodeoxycholová, kyselina glykocholová, kyselina glykochenodeoxycholová, kyselina taurocholová a kyselina taurochenodeoxycholová.

4.1 Charakterizace BDD elektrody

Prvním provedeným měřením byla charakterizace BDD elektrody pomocí roztoku hexakynoželeznanu draselného ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$). Tato látka poskytuje signál jak v katodické, tak anodické oblasti proudů. Zjišťován byl vliv leštění BDD elektrody suspenzí aluminu na lešticí podložce na redoxní odezvu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. Nejprve byl změřen signál bez vyleštění elektrody a následně při leštění v různých časových intervalech, konkrétně 5 s, 10 s a 15 s.

Z obr. 6. je patrné, že při leštění docházelo k mírnému snížení rozdílu potenciálu katodického a anodického píku ΔE_p z hodnoty 130,3 mV na hodnotu 75,5 mV. Tato hodnota svědčí o quazireversibilním charakteru oxidace/redukce a relativně rychlé kinetice přenosu elektronu, jelikož hodnota ΔE_p se blíží teoretické hodnotě pro reversibilní jednoelektronový děj 59 mV. Po leštění 15 s byl signál ustálený. Proto byla pro veškerá další měření zvolena optimální doba leštění pracovní elektrody 15 s.



Obr. 6: Cyklické voltamogramy $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ o koncentraci 1 mmol dm^{-3} v 1 mol dm^{-3} chloristanu draselném. Cyklické voltamogramy jsou zaznamenány bez leštění (označeno 0 s) a následně s leštěním BDD elektrody po dobu 5 s, 10 s a 15 s. Rychlost polarizace byla $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

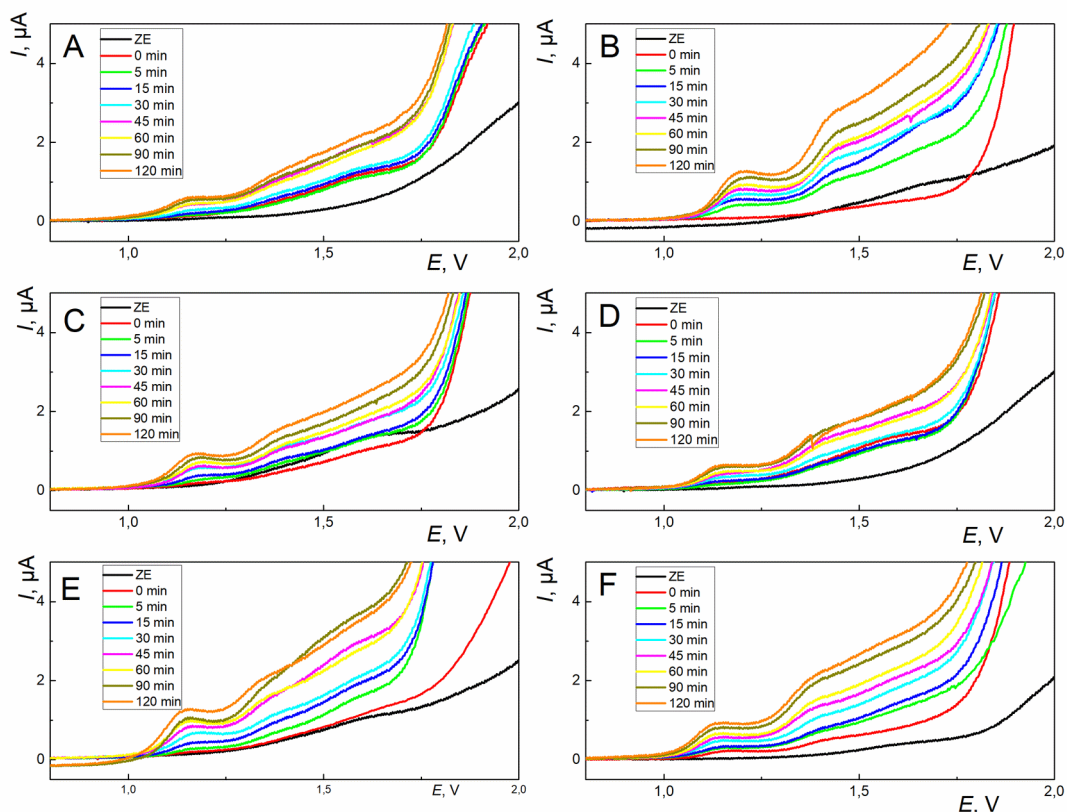
4.2 Časový průběh dehydratace a elektrochemické oxidace žlučových kyselin a jejich konjugátů

Elektrochemické chování kyseliny cholové a chenodeoxycholové již ve svých pracích popsal Klouda [48, 24], který se věnoval studii jejich vlastností v prostředí kyseliny chloristé v acetonitrilu. V této diplomové práci byly kromě samotných žlučových kyselin studovány i jejich konjugáty a cílem bylo zjistit, zda jsou jejich elektrochemické vlastnosti obdobné jako u žlučových kyselin a zda je možné i konjugáty žlučových kyselin stanovovat elektrochemicky.

Bylo studováno elektrochemické chování žlučových kyselin a jejich konjugátů v prostředí s minimálním obsahem vody (0,55 %), $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu. Byl sledován časový průběh dehydratace a následné oxidace jednotlivých studovaných sloučenin – voltamogramy z tohoto měření jsou uvedeny na obr. 7. Byl

sledován postupný nárůst signálu až do jeho ustálení v předem určených časových intervalech.

Měření bylo prováděno v rozmezí potenciálu od 0 V do +2,0 V metodou cyklické voltametrie. Rychlost polarizace byla $0,1 \text{ V s}^{-1}$. Pro lepší názornost jsou voltamogramy zobrazovány až od +0,8 V, jelikož bylo zjištěno, že veškeré měřené sloučeniny poskytují signál kolem +1,1 V.



Obr. 7: LS voltamogramy A) cholové kyseliny, B) chenodeoxycholové kyseliny, C) glykocholové kyseliny, D) glykochenodeoxycholové kyseliny, E) taurocholové kyseliny, F) taurochenodeoxycholové kyseliny. Koncentrace žlučových kyselin $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ v $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselině chloristé v acetonitrilu (obsah vody 0,55 %). Rychlost polarizace elektrody 100 mV s^{-1} , měřeno od 0 V do +2,0 V. První voltamogram byl zaznamenán bezprostředně po smísení roztoku žlučové kyseliny s acetonitrilem a přidání kyseliny chloristé. Následující voltamogramy byly měřeny v určitých časových intervalech, které jsou uvedeny v legendě. Černou barvou je vždy znázorněn základní elektrolyt.

Z obr. 7 je patrné, že veškeré měřené žlučové kyseliny a jejich konjugáty poskytují viditelné signály v podobné oblasti potenciálu. Signál kontinuálně narůstá až do času

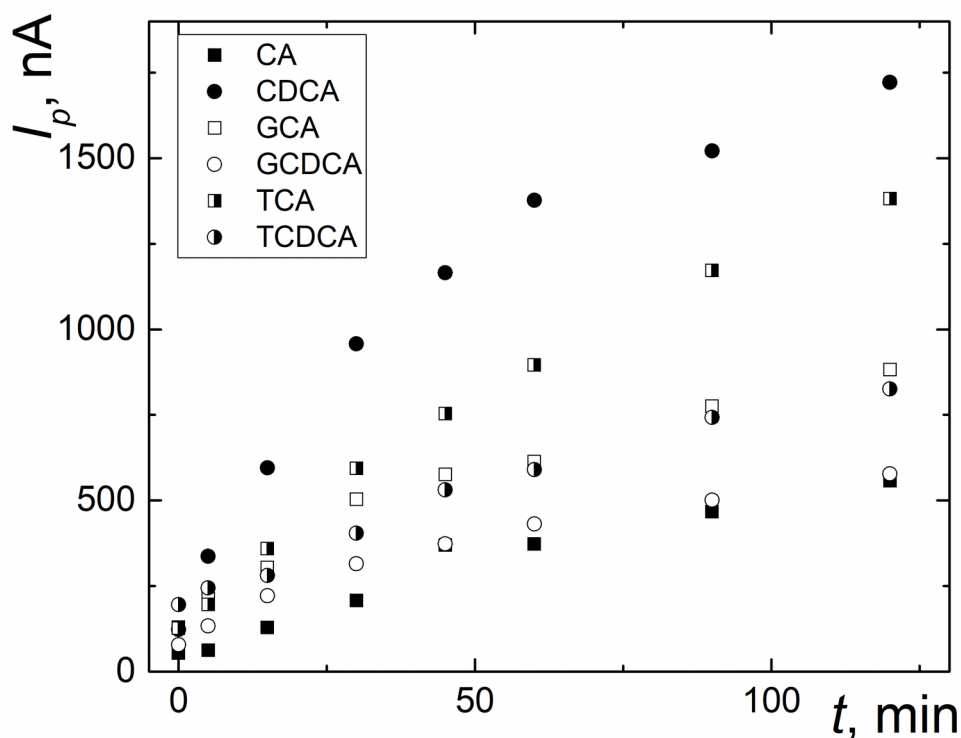
120 minut, kdy byl již u všech měřených látek stabilní a nedocházelo k jeho navyšování.

V Tabulce 2 jsou shrnuty potenciály, při kterých poskytují žlučové kyseliny a jejich konjugáty odezvu po 120 minutách od přípravy roztoku. Z tabulky je patrné, že jednotlivé sloučeniny poskytují signál v oblastech potenciálů, které jsou si velice blízké. Pokud bychom chtěli metodu využít pro kvalitativní analýzu, nebylo by to možné. Potenciály od sebe nejsou natolik vzdálené, aby bylo s určitou jistotou možné identifikovat, o kterou z měřených látek se jedná.

Tabulka 2: Potenciál prvního a druhého píku jednotlivých měřených žlučových kyselin a jejich konjugátů po 120 minutách dehydratační reakce.

	CA	CDCA	GCA	GCDCA	TCA	TCDCa
1. pík [V]	1,16	1,28	1,19	1,11	1,18	1,17
2. pík [V]	1,48	1,44	1,36	1,39	1,38	1,46

Na následujícím grafu (obr. 8) je uvedena závislost výšky proudu na čase pro jednotlivé měřené žlučové kyseliny.



Obr. 8: Závislost výšky proudu I_p při potenciálu v maximu píku na čase od doby přípravy v měřeného roztoku, pro kyselinu cholovou (■) ($E_p = +1,191 V$), chenodeoxycholovou (●) ($E_p = +1,215 V$), glykocholovou (□) ($E_p = +1,170 V$), glykochenodeoxycholovou (○) ($E_p = +1,157 V$), taurocholovou (▣) ($E_p = +1,167 V$) a taurochenodeoxycholovou (◐) ($E_p = +1,172 V$). Koncentrace žlučových kyselin $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ v acetonitrilu a $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chloristé. Rychlost polarizace elektrody $0,1 V s^{-1}$. Měřeno v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé (obsah vody 0,55 %).

Z grafu (obr. 8) je patrné, že s narůstajícím časem se zvyšuje i velikost odezvy. U jednotlivých žlučových kyselin je nárůst proudu různý. Tento nárůst je způsoben zvyšováním koncentrace elektroaktivních produktů dehydratační reakce v čase. Je patrné, že kyselina chenodeoxycholová poskytuje celkově nejvyšší a nejlépe detekované signály. I z toho důvodu byla využita v dalších pracích pro studium mechanismu reakce dehydratace i oxidace [1]. Oproti tomu kyselina cholová poskytuje signály nejmenší. Nelze ale říci, že by konjugáty kyseliny chenodeoxycholové vykazovaly vyšší signály než konjugáty

kyseliny cholové. Naopak konjugáty kyseliny cholové vykazují vyšší proudy, než konjugáty kyseliny chenodeoxycholové.

Tímto měřením bylo potvrzeno, že konjugáty žlučových kyselin se v daném prostředí a za daných podmínek chovají obdobně, jako samotné žlučové kyseliny a je možné je elektrochemicky detekovat.

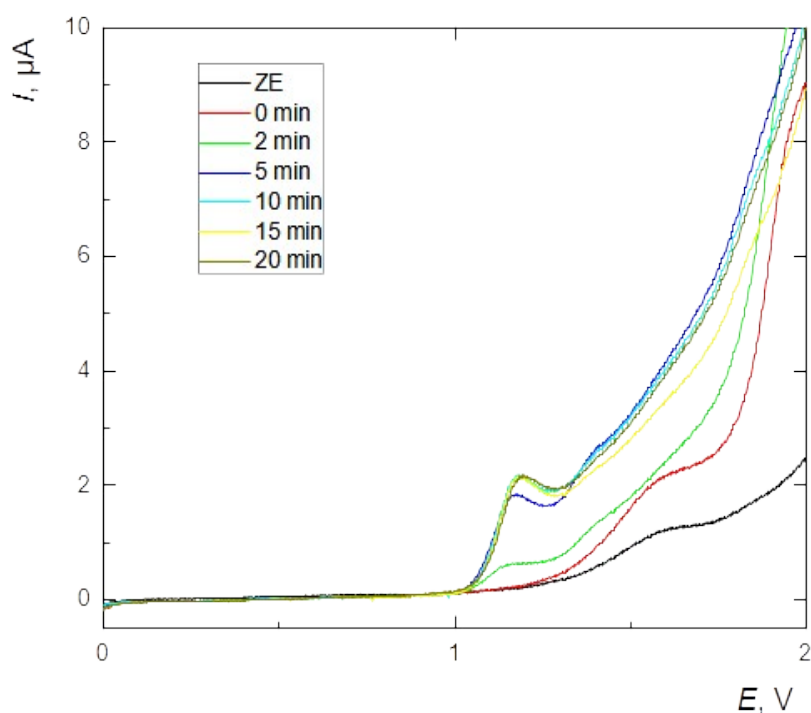
4.3 Vliv zahřívání měřeného roztoku na voltametrickou odezvu

Jak je patrné z výsledků uvedených v předchozí kapitole, ustálení odezvy žlučových kyselin je časově náročné. Limitujícím krokem je probíhající dehydratace, která probíhá postupně v časovém horizontu přibližně 120 minut, jak bylo zjištěno v předchozím měření. Pro další měření bylo potřeba zkrátit tuto dobu, a s tím zkrátit i dobu všech případných následných analýz.

Obdobnou problematikou se již zabývali Klouda [5] a Jelšíková [6], z jejichž prací byla převzata optimální teplota 50 °C, pro urychlení dehydratace žlučových kyselin při zahřívání, což výrazně zjednodušilo tento proces.

Zahřívání roztoku žlučových kyselin v prostředí acetonitrilu a kyseliny chloristé probíhalo ve vodní lázni při stálé teplotě 50 °C. Zjišťována byla optimální doba zahřívání, při které bude signál dosahovat obdobných hodnot, jako při měření časových závislostí a zároveň bude stabilní.

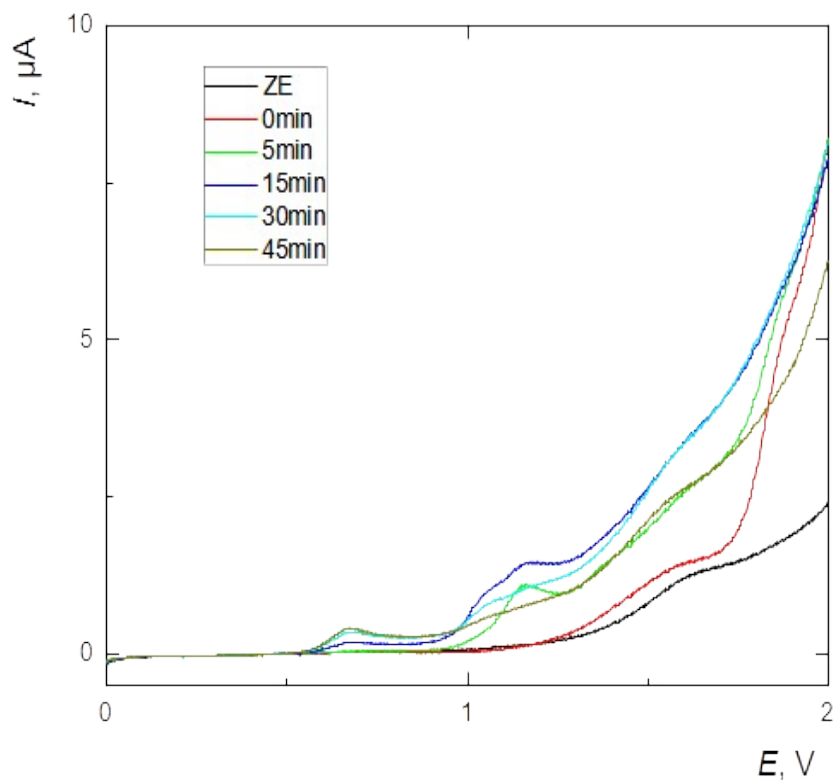
Jako první byla proměřena kyselina chenodeoxycholová – obr. 9.



Obr. 9: LS voltamogramy chenodeoxycholové kyseliny ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) v $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselině chloristé v acetonitrilu, rychlost polarizace elektrody $0,1 \text{ V s}^{-1}$, zobrazující závislost proudu na potenciálu při různě dlouhém intervalu zahřívání roztoku – ihned po přípravě roztoku, po 2 min, 5 min, 10 min, 15 min a 20 min. Zahřívání bylo provedeno ve vodní lázni při teplotě $50 \text{ }^\circ\text{C}$, po stanovené době byl roztok ihned ochlazen, aby byly zastaveny veškeré probíhající reakce.

Z grafu (obr. 9) je patrné, že signál se navyšoval až do 10 minut, kde je maximální a nadále pak už nenarůstá a je stabilní. Je tedy zřejmé, že zahřívání po určitou dobu ve vodní lázni vyhřáté na $50 \text{ }^\circ\text{C}$ lze využít pro urychlení dehydratace. Signál je poté obdobný, jako po tom, co probíhala samovolná dehydratace ve stejném prostředí po dobu dvou hodin.

Následně byla obdobně proměřena časová závislost zahřívání pro cholovou kyselinu – obr. 10.



Obr. 10: LS voltamogramy cholové kyseliny ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) v $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselině chloristé v acetonitrilu, rychlost polarizace elektrody $0,1 \text{ V s}^{-1}$, zobrazující závislost proudu na potenciálu při různě dlouhém intervalu zahřívání roztoku – ihned po přípravě roztoku, po 5 min, 15 min, 30 min a 45 min. Zahřívání bylo provedeno ve vodní lázni při teplotě $50 \text{ }^\circ\text{C}$, po stanovené době byl roztok ihned ochlazen, aby byly zastaveny veškeré probíhající reakce.

Z grafu (obr. 10) je patrné, že chování kyseliny cholové při zahřívání ve vodní lázni ($t = 50 \text{ }^\circ\text{C}$) je rozdílné od chování kyseliny chenodeoxycholové. Po pětiminutovém zahřívání je chování obou kyselin obdobné – signál s přibývajícím dobou zahřívání narůstá. Když byla ale kyselina cholová zahřívána déle než 5 minut, začal se tvořit nový pík v oblasti $+0,7 \text{ V}$, zároveň s tím signál v oblasti $+1,2 \text{ V}$ nejprve dále narůstal. S přibývajícím dobou zahřívání však došlo ke změně tvaru píku a následně poté od 30 minut začal signál klesat. Toto je nejspíše zapříčiněno oxidací dalšího vznikajícího produktu dehydratace, který vzniká jen u CA a u CDCA k obdobné reakci nedochází. Tvorba tohoto dehydratačního produktu je spojena s C-12 α -hydroxylovou skupinou kyseliny cholové.

Zároveň je možné tohoto poznatku využít k rozlišení voltametrické odezvy kyseliny cholové a kyseliny chenodeoxycholové [2].

Pro účely této práce a analýzu žlučových kyselin je podstatný signál v oblasti + 1,2 V, který odpovídá samovolné dehydrataci kyseliny v základním elektrolytu. Tento signál byl nejvyšší při pětiminutovém zahřívání, kdy ještě neprobíhaly žádné další reakce a vznikal pouze tento sledovaný signál. Z tohoto důvodu nebyla nárůstu nového signálu věnována další pozornost a jako optimální doba zahřívání pro obě kyseliny byl zvolen čas 5 minut, kdy jsou oba signály stabilní. Dosažené výsledky se shodují se závěry, které byly popsány v práci zabývající se studiem možností analýzy žlučových kyselin v séru pomocí voltametrie [2].

Optimalizace doby zahřívání byla provedena pouze pro kyselinu cholovou a chenodeoxycholovou s předpokladem, který se zakládá na předchozích měřeních, že konjugáty budou vykazovat obdobné chování. Veškerá další měření byla tedy prováděna po zahřátí roztoku určité kyseliny, nebo jejího konjugátu v acetonitrilu a 0,1 mol dm⁻³ kyseliny chloristé ve vodní lázni při teplotě 50 °C.

Protože některé analýzy, jak v této práci, ale zejména poté potencionální další měření například HPLC, či jiné techniky v dalších výzkumech, jsou časově náročné, bylo nutné ověřit, zda je signál, získaný po zahřívání ve vodní lázni stabilní. Byla proto zjišťována opakovatelnost měření pro veškeré měřené látky. Studované látky byly nejprve zahřáty ve vodní lázni o dané teplotě, po dobu 5 minut. Následně byly schlazeny ve vodě na laboratorní teplotu, opět ve vodní lázni, aby byly ihned zastaveny jakékoliv další případné reakce, probíhající při delším zahřívání, a ihned proměřeny. Poté byl proměřen signál daných žlučových kyselin vždy 10x po sobě, mezi každým měřením byla elektroda přešetřena. Ze získaných hodnot byly vypočteny směrodatné odchylky, které jsou shrnuty spolu s výsledky měření v následující tabulce.

Tabulka 3: Opakovatelnost měření pro jednotlivé žlučové kyseliny a jejich konjugáty po zahřívání ve vodní lázni o teplotě 50 °C po dobu 5 minut. Koncentrace žlučových kyselin $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ v 0,1 mol dm^{-3} kyselině chloristé v acetonitrilu. Rychlost polarizace elektrody 100 mV s^{-1} . Vyhodnoceno z měření provedeného po 5minutovém zahřívání analyzovaného roztoku ve vodní lázni při 50 °C, bylo provedeno deset po sobě jdoucích měření, mezi každým měřením byla BDD elektroda vyleštěna.

	CA	CDCA	GCA	GCDCA	TCA	TCDCA
I [μA]	1,827	1,083	1,024	0,713	0,646	0,818
s [μA]	0,053	0,036	0,030	0,019	0,028	0,029
RSD [%]	5,28	3,59	3,00	1,92	2,83	2,94

Z provedených měření jejichž výsledky jsou shrnuty v tabulce 3, je patrné že veškeré studované látky jsou po zahřátí stabilní minimálně po měřenou dobu, což odpovídá 60 minutám, ale lze předpokládat, že budou stabilní i nadále. Veškerá další měření byla tedy prováděna se žlučovými kyselinami, které byly nejprve zahřáty po dobu 5 minut ve vodní lázni na 50 °C a následně zchlazeny, aby se zastavily případné probíhající reakce.

Pokud bychom dosažené proudy porovnali s těmi, kterých bylo dosaženo při samovolné dehydrataci (obr. 8), je patrné, že u kyseliny cholové a taurocholové došlo k poměrně výraznému navýšení proudu. Při samovolné dehydrataci byla výška proudu kyseliny cholové po 120 minutách přibližně + 1,3 V, po zahřívání byl proud o 0,5 V vyšší. U GCA došlo také k navýšení, i když menšímu, konkrétně o asi 0,1 V. U CDCA naopak došlo k poměrně výraznému snížení proudu – při samovolné dehydrataci byl přibližně + 1,6 V a po zahřívání byl pouze 0,7 V, což je téměř 1 V rozdíl. U GCDCA došlo také ke snížení proudové odezvy, ale pouze o cca 0,2 V. Výšky proudu u TCDCA byla v obou případech srovnatelná. Celkově lze ale říci, že proudové odezvy byly dostatečně vysoké, aby bylo možné žlučové kyseliny dobře rozpoznat.

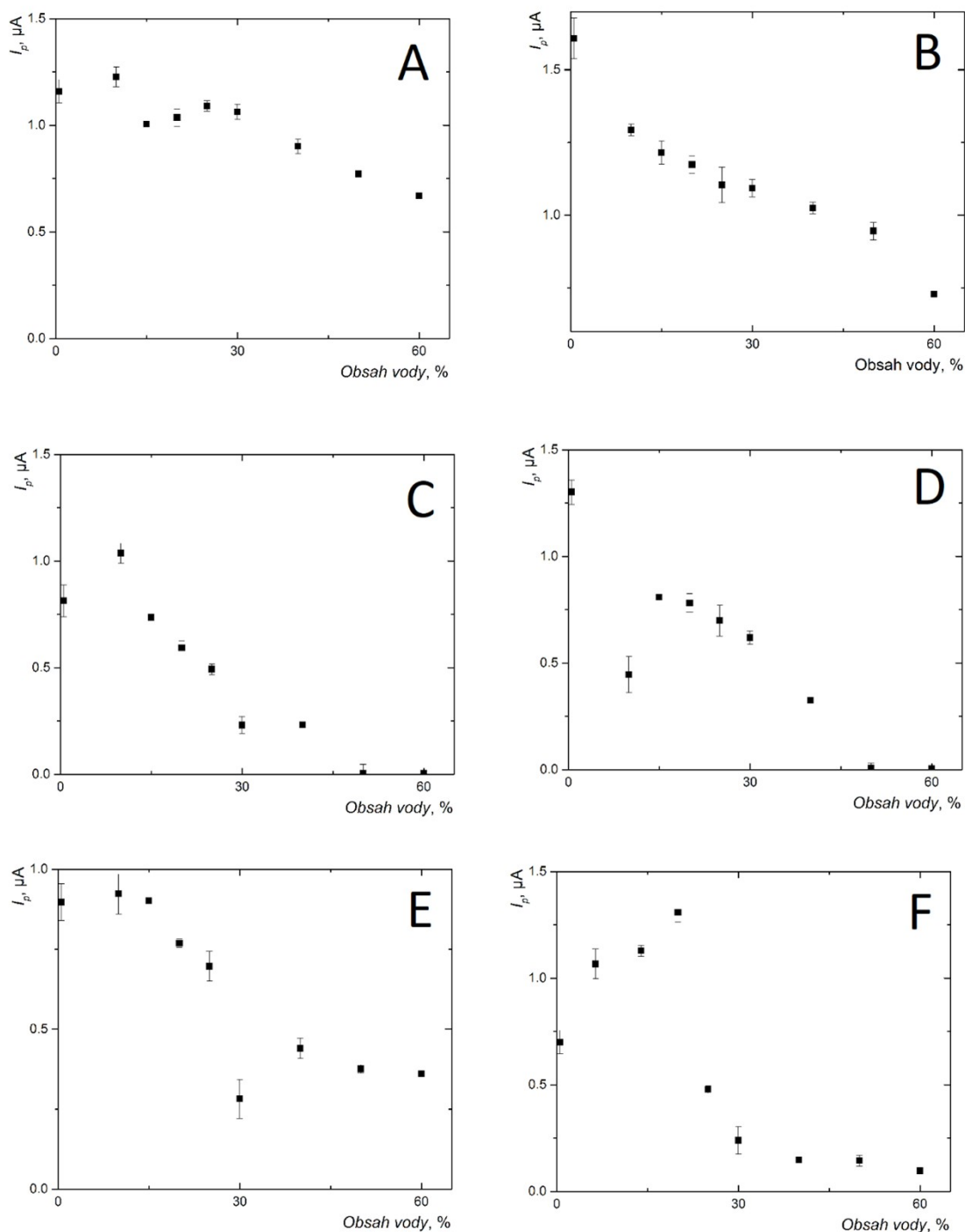
4.4 Závislost anodické odezvy na obsahu vody v základním elektrolytu

V dalším kroku vývoje metody byl zkoumán vliv obsahu vody v základním elektrolytu na anodický signál při měření. Vždy byl nejprve změřen základní elektrolyt, poté samotná žlučová kyselina po zahřátí 5 minut na 50 °C a následně byla do roztoku postupně přidávána deionizovaná voda v takovém množství, aby odpovídala požadovanému

procentuálnímu obsahu vody. Žlučové kyseliny byly stejně jako u předchozích měření o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Tato měření byla prováděna zejména z důvodu dalšího rozvoje metody, jako je elektrochemická detekce pro HPLC. Vzhledem k tomu, že ve voltamometrických měřeních je základní elektrolyt čistě organický s minimálním obsahem vody a velice kyselý, bylo zkoumáno, do jaké míry lze tyto podmínky měnit, aby byl anodický signál žlučových kyselin stále přítomný a dostatečně stabilní.

V následujících grafech (obr. 11) jsou shrnuty získané výsledky pro jednotlivé žlučové kyseliny.



Obr 11: Závislost proudu na procentuálním obsahu vody u jednotlivých žlučových kyselin ($c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Měření bylo prováděno v základním elektrolytu – $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselině chloristé v acetonitrilu, po dehydrataci zahříváním po dobu 5 minut ve vodní lázni o teplotě $50 \text{ }^\circ\text{C}$. A) cholová kyselina, B) chenodeoxycholová kyselina, C) glykocholová kyselina, D) glykochenodeoxycholová kyselina, E) taurocholová kyselina, F) taurochenodeoxycholová kyselina. Nejistota pro $n = 3$ je vyjádřena pomocí směrodatné odchylky.

Z grafů je patrné, že s přibývajícím procentuálním množstvím vody v základním elektrolytu klesá anodický signál žlučových kyselin. U jednotlivých kyselin se ale strmost poklesu poměrně výrazně liší. Stejně tak je pro některé kyseliny optimální minimální procento vody, tedy 0,55 %, které se vyskytují v roztoku z kyseliny chloristé – kyselina chenodeoxycholová a glykochenodeoxycholová. Pro taurocholovou kyselinu, glykocholovou kyselinu a cholovou kyselinu je optimálních 10 % vody v roztoku. Kyselina taurochenodeoxycholová má optimum až při obsahu vody v roztoku 20 %.

Další možností, jak modifikovat obsah vody v roztoku bylo její přidání do roztoků před dehydratací. Z článku zabývajícího se studiem voltametričného stanovení žlučových kyselin v séru je známé, že pokud je obsah vody v základním elektrolytu vyšší než zmiňovaných 0,55 % v momentu, kdy probíhá dehydratace, dochází ke snižování oxidačního signálu. Při vyšším obsahu vody může dojít k úplnému zastavení reakce a oxidační signál pak nelze naměřit vůbec [2].

Teoreticky je tedy možné měřit signál i ve vodných roztocích, případně například v roztocích pufrů, je ale možné je k roztoku přidávat až po proběhlé dehydrataci žlučových kyselin. Pro účely práce bylo nadále pracováno s minimálním obsahem vody, tedy 0,55 %. Nárůsty proudů nejsou tak výrazné

4.5 Změny pH roztoku

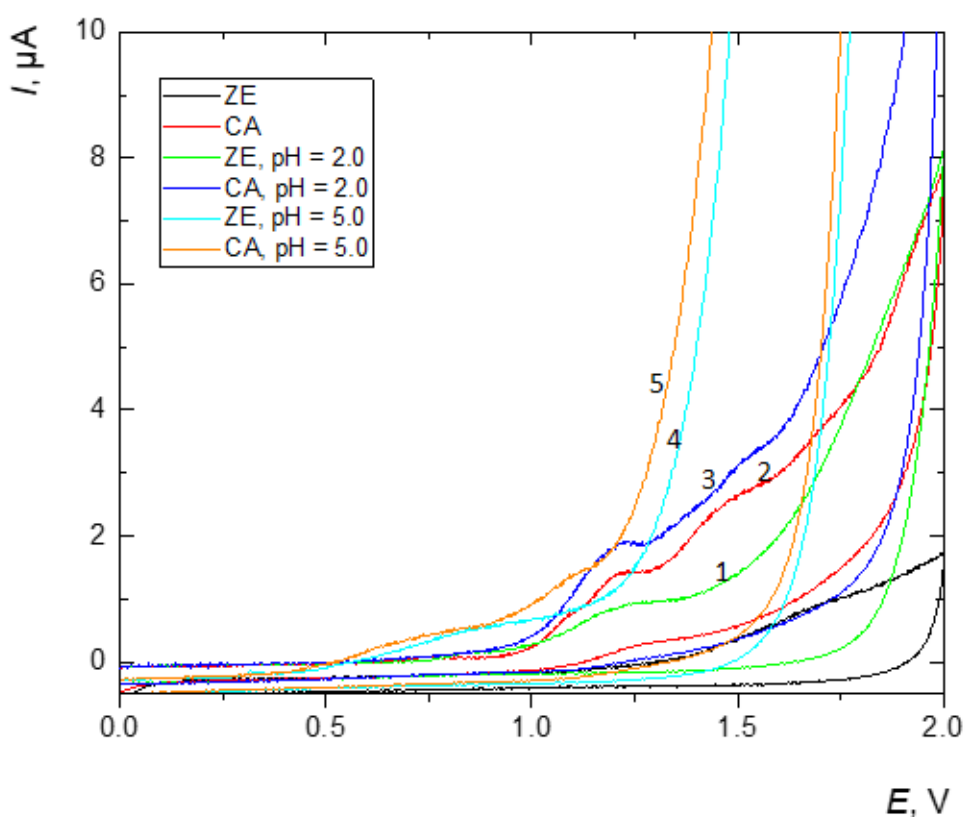
Dalším z cílů této práce bylo zjistit, zda je možné upravit podmínky tak, aby byly využitelné v dalších experimentech. Proto bylo dalším ze zjišťovaných parametrů měření signálu žlučových kyselin po oxidaci při různých hodnotách pH.

Pro tyto účely byly připraveny 3 pufrы tak s rozdílnými pH. Konkrétně se jednalo o octanový pufr (pH = 5,0) a fosfátový pufr (pH = 2,0 a pH = 7,0), všechny o shodné koncentraci $c = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Již při prvních pokusech o naměření vyšlo najevo, že pracovat v pH = 7 nebude možné. Samotný pufr o připravené koncentraci neměl dostatečnou pufráční kapacitu. Do roztoku byl proto přikápnut hydroxid sodný, aby bylo zvýšeno pH. Po tomto kroku ale docházelo k okamžitému vysrážení žlučové kyseliny v roztoku. Proto se v dalších experimentech pokračovalo pouze s pufrы o pH = 2 a pH = 5. Zároveň bylo zjištěno, že pokud je roztok měřen na pH metru, kvůli úpravě pH pomocí NaOH, uvolňují se z vodíkové pH

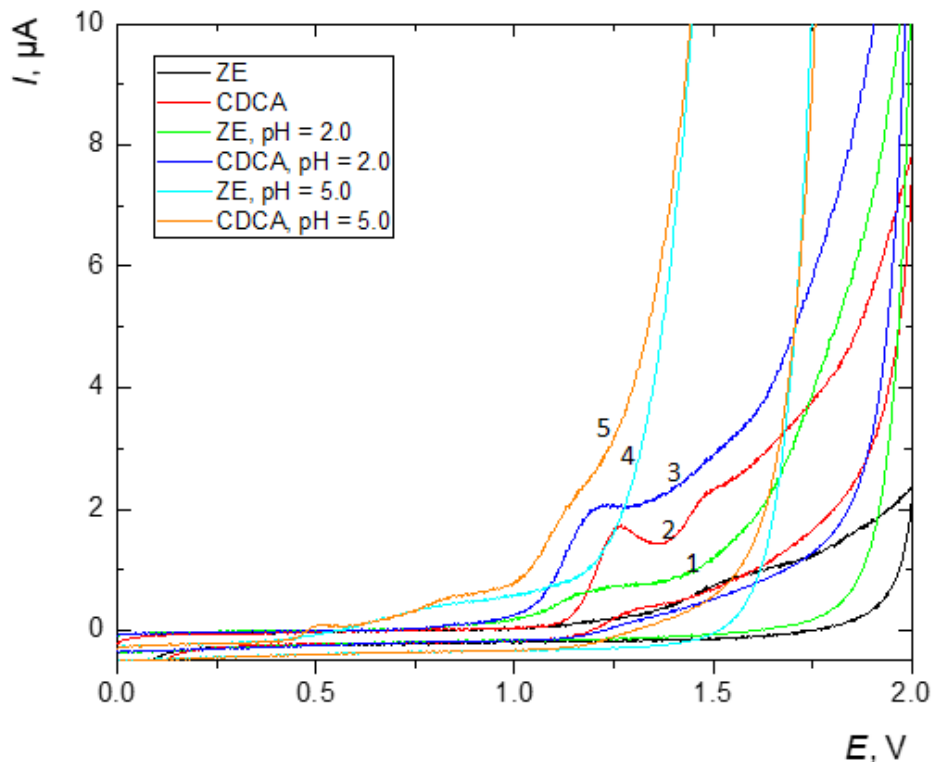
elektrody K^+ ionty, které následně poskytují voltametrický signál a narušují tak měření. Tato skutečnost byla ověřena přidáním draselných iontů do roztoku a následným proměřením anodického signálu. V takovémto roztoku byl viditelný pík ve stejné oblasti potenciálů, jako po měření pH pomocí pH metru. Proto bylo měření pH prováděno až po proměření voltametrické odezvy a takto naměřené hodnoty pH jsou uváděny jako pH^* .

Měření bylo opět provedeno na CA a CDCA s předpokladem, že jejich konjugáty budou vykazovat obdobné chování, jak již bylo v rámci práce několikrát potvrzeno. Nejprve byla proměřena cholová kyselina, výsledný voltamogram je uveden na obr. 12.



Obr. 12: Voltamogram kyseliny cholové při různých hodnotách pH v octanovém pufru ($pH = 5,00$, $pH^* = 4,60$) a fosfátovém pufru ($pH = 2,00$, $pH^* = 1,95$). Koncentrace cholové kyseliny $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ v prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu. Měření probíhalo po dehydrataci kyseliny ve vodní lázni o teplotě $50 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 minut. 1 – Základní elektrolyt s puforem, $pH = 2,0$, 2 – CA, 3 – CA v $pH = 2,0$, 4 – Základní elektrolyt s puforem, $pH = 5,0$, 5 – CA v $pH = 5,0$.

Následně byla stejně proměřena i kyselina chenodeoxycholová, graf závislosti výšky proudu na změnách pH je zobrazen na Obr. 13.



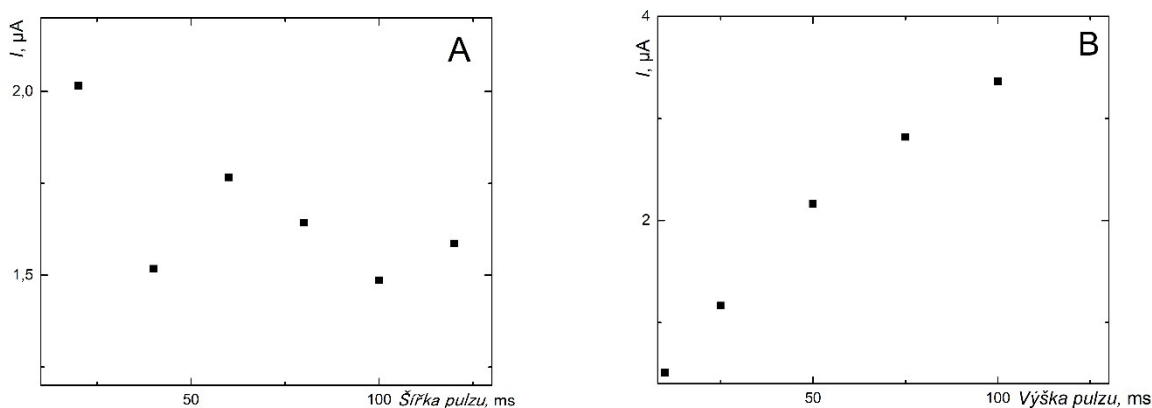
Obr. 13: Voltamogram kyseliny chenodeoxycholové při různých hodnotách pH v octanovém pufru ($pH = 5,00$, $pH^* = 4,40$) a fosfátovém pufru ($pH = 2,00$, $pH^* = 1,80$). Koncentrace cholové kyseliny $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ v prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu. Měření probíhalo po dehydrataci kyseliny ve vodní lázni o teplotě $50 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 minut. 1 – Základní elektrolyt s puftrem, $pH = 2,0$, 2 – CDCA, 3 – CDCA v $pH = 2,0$, 4 – Základní elektrolyt s puftrem, $pH = 5,0$, 5 – CDCA v $pH = 5,0$.

Z grafů pro různá pH je patrné, že obě žlučové kyseliny reagují srovnatelně a závislost má obdobný průběh. Při použití fosfátového pufru, kdy je pH^* roztoku kolem 2 je patrné, že signál je stále dobře rozlišitelný i přes skutečnost, že došlo ke zvýšení pozadí signálu základního elektrolytu s puftrem. Pík je stále dobře zřetelný a odlišitelný od signálu základního elektrolytu. Při pohledu na signály základního elektrolytu a žlučových kyselin s octanovým puftrem o $pH = 5,0$, je patrné, že dochází k úniku základního elektrolytu výrazně dříve – již při potenciálech kolem $+1,25 \text{ V}$, dochází tedy ke zmenšování

potenciálového okna. I přes tuto skutečnost je ale stále možné rozeznat pík žlučových kyselin, díky patrnému nárůstu proudu. Rozdíl proudů mezi základním elektrolytem a žlučovou kyselinou je však výrazně nižší, a to zejména u kyseliny cholové, kde můžeme pozorovat pouze malý nárůst proudu.

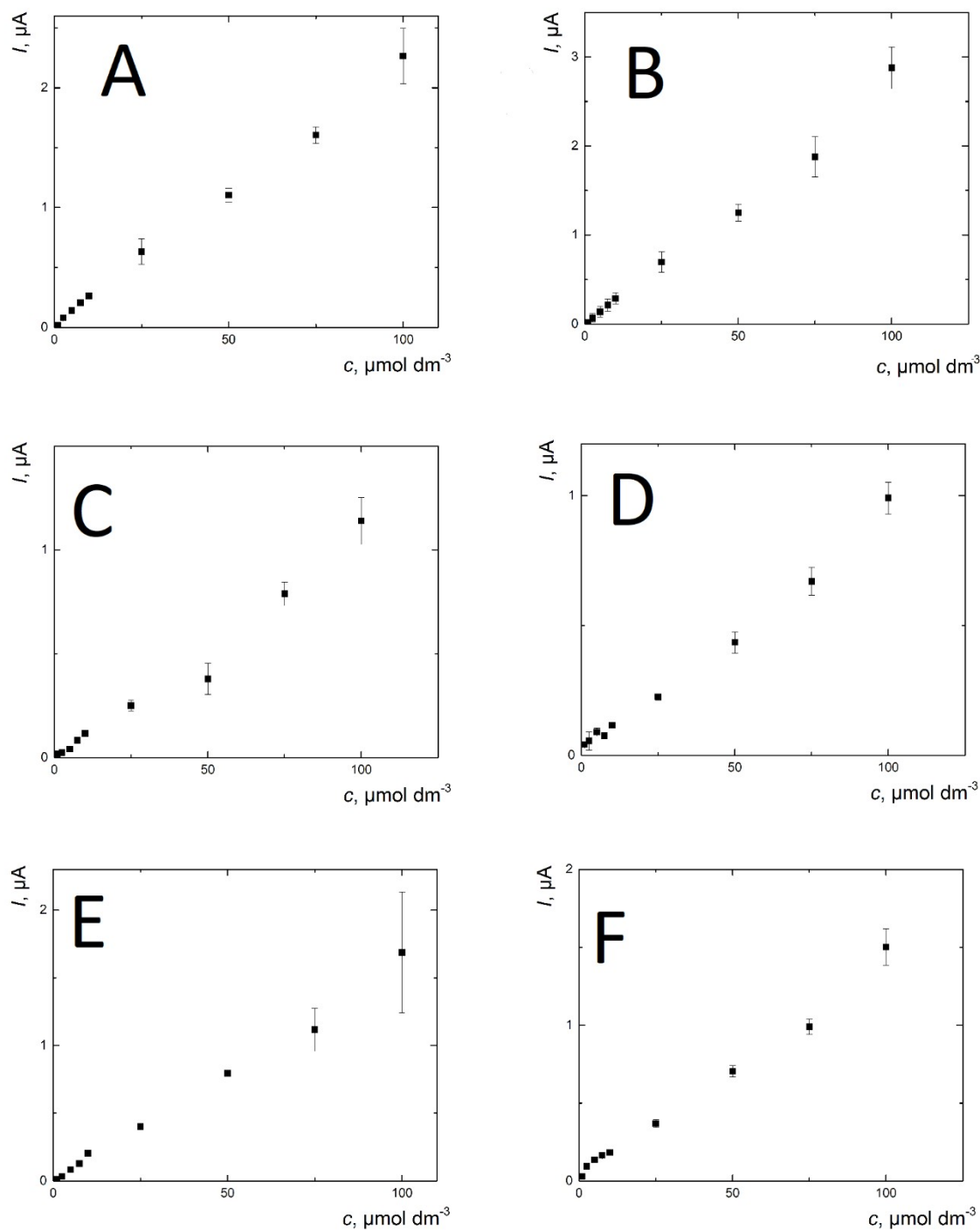
4.6 Kalibrace

Vzhledem k výrazné voltametrické odezvě a po ověření stability měřených sloučenin byly pro veškeré studované sloučeniny proměřeny koncentrační závislosti. Ty byly měřeny metodou diferenční pulzní voltametrie. V prvním kroku byly optimalizovány parametry této metody. Optimalizována byla výška a šířka pulzu v roztoku kyseliny chenodeoxycholové o koncentraci $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ v prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu. Grafy pro optimalizaci výšky a šířky pulsu jsou uvedeny na Obrázku 14. Jako optimální byla zvolena šířka pulsu 20 ms a výška 100 mV. Rychlost skenu byla zvolena 50 mV s^{-1} . Za těchto podmínek byly proměřeny koncentračních závislosti veškerých studovaných analytů v rozsahu $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ až $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$; zobrazeny jsou na obr. 14.



Obrázek 14: Optimalizace šířky pulsu (A) a výšky pulsu (B) metody DPV. Měřeno pro kyselinu chenodeoxycholovou ($c = 50,0 \mu\text{mol dm}^{-3}$) v prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu (obsah vody 0,55 %) po zahřátí ve vodní lázni na 50°C po dobu 5 minut.

Za těchto podmínek byly proměřeny veškeré studované žlučové kyseliny. Kalibrační závislosti jsou zobrazeny na Obr. 15.



Obr. 15: Koncentrační závislost velikosti proudu píku I na koncentraci A) cholové kyseliny, B) chenodeoxycholové kyseliny, C) glykocholové kyseliny, D) glykochenodeoxycholové kyseliny, E) taurocholové kyseliny, F) taurochenodeoxycholové kyseliny. Měřeno metodou DPV (šířka pulsu 20 ms, výška pulsu 0,1 V) v prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chloristé v acetonitrilu (obsah vody 0,55 %) po zahřátí ve vodní lázni na 50°C po dobu 5 minut. Rychlost polarizace $0,05 \text{ V s}^{-1}$. Nejistota pro $n = 3$ je vyjádřena pomocí směrodatné odchylky.

Naměřené hodnoty byly následně proloženy lineární regresí. V následující tabulce 2 jsou uvedeny rovnice získaných přímek spolu s vypočtenými limity detekce a kvantifikace.

Tabulka 2: Rovnice jednotlivých kalibračních závislostí a její základní charakteristiky.

	Rovnice	R ²	LOD [μmol dm ⁻³]	LOQ [μmol dm ⁻³]
CA	$I [\mu\text{A}] = 0,022 \cdot c [\mu\text{mol dm}^{-3}] + 0,030$	0,998	7,90	26,34
CDCA	$I [\mu\text{A}] = 0,027 \cdot c [\mu\text{mol dm}^{-3}] + 0,013$	0,992	11,16	37,20
GCA	$I [\mu\text{A}] = 0,010 \cdot c [\mu\text{mol dm}^{-3}] + 0,023$	0,977	8,79	29,31
GCDCA	$I [\mu\text{A}] = 0,009 \cdot c [\mu\text{mol dm}^{-3}] + 17,38$	0,990	9,77	32,48
TCA	$I [\mu\text{A}] = 0,016 \cdot c [\mu\text{mol dm}^{-3}] + 0,932$	0,994	14,99	49,96
TCDCa	$I [\mu\text{A}] = 0,014 \cdot c [\mu\text{mol dm}^{-3}] + 0,039$	0,992	6,25	20,84

Z tabulky je patrné, že limity detekce i kvantifikace se u všech studovaných látek pohybují řádově podobně, pohybují se v jednotkách μmol dm⁻³. Nejvyšší směrnice koncentrační závislosti byly získány pro samotné žlučové kyseliny, nejnižší pro konjugáty s glycinem, tyto rozdíly však nejsou příliš významné. Konjugace tedy neovlivňuje výrazně chování žlučových kyselin. Nejnižší limity detekce byly získány pro kyselinu cholovou, nejvyšší pro kyselinu taurocholovou.

Hodnoty *LOD* a *LOQ* jsou v porovnání s hodnotami z literatury při použití jiných technik vyšší. V teoretické části je uvedeno, že limit detekce metody HPLC je $6,1 \cdot 10^{-2}$ μmol dm⁻³ a limit kvantifikace je 0,12 μmol dm⁻³ [41]. Vzhledem k výskytu žlučových kyselin a jejich konjugátů v biologických matricích lze však předpokládat před vlastním stanovením jejich extrakci, v rámci které mohou být analyty prekoncentrovány tak, aby byly dosažené *LOD* dostatečné.

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo ověřit, zda se glycinové a taurinové konjugáty žlučových kyselin chovají v prostředí kyseliny chloristé a acetonitrilu obdobně jako již studované kyseliny – cholová a chenodeoxycholová. Tuto domněnku se již na začátku práce podařilo potvrdit a bylo díky tomu možné pracovat dále na vývoji metody a optimalizaci podmínek voltametrického stanovení těchto sloučenin.

Bylo zjištěno, že u veškerých studovaných látek je možné probíhající reakci dehydratace urychlit zahříváním ve vodní lázni po dobu 5 minut při 50 °C. V tomto časovém úseku nezačnou vznikat žádné nežádoucí produkty bočních reakcí a množství vzniklého produktu odpovídá množství, které v daném prostředí samovolně vzniká po dvou hodinách dehydratace v prostředí 0,1 mol dm⁻³ kyseliny chloristé v acetonitrilu. Tohoto zjištění bylo využíváno při všech dalších měřeních a výrazně to usnadnilo a urychlilo práci.

Dále byla pozornost zaměřena na podmínky, ve kterých je možno provádět voltametrické měření již po proběhlé dehydratační reakci. Tyto skutečnosti byly zjišťovány zejména kvůli případnému dalšímu využití metody například v HPLC. Bylo tedy zjišťováno, jak se mění odezva analytů v závislosti na složení základního elektrolytu.

První studovanou podmínkou byl obsah vody v roztoku. Veškerá předchozí měření byla prováděna v prakticky bezvodém prostředí (0,55 % vody), protože bylo zjištěno, že přítomnost vody inhibuje dehydratační krok. Z tohoto měření nelze stanovit jednotný závěr pro veškeré studované analyty, jelikož každý se choval jinak. Ve většině případů bylo možné naměřit nejvyšší signál právě v bezvodém prostředí nebo v přítomnosti 10 % vody v roztoku. Strmost poklesu signálu s přibývajícím procentem vody se u jednotlivých analytů výrazně lišila. Pro mnohé z analytů je ale patrné, že by bylo možné je stanovit i v prostředí, které vodu obsahuje.

Dalším parametrem, který byl studován, bylo pH základního elektrolytu. Z dosažených výsledků je patrné, že je možné vzniklé produkty dehydratační reakce detekovat i v jiném než kyselém prostředí, které bylo používáno v průběhu většiny práce.

Posledním z provedených měření bylo studium koncentračních závislostí pro jednotlivé žlučové kyseliny a jejich konjugáty. Veškeré stanovované analyty vykazují linearitu v koncentračním rozsahu 1 μmol dm⁻³ až 100 μmol dm⁻³. Byly dosaženy mikromolární

limity detekce.

Z dosavadních zjištěných výsledků lze usuzovat, že elektrochemické metody mají potenciál v analýze žlučových kyselin a jejich konjugátů. Díky tomu, že vznikající dehydratační produkty jsou stabilní i v pozměněných podmínkách, než při kterých je nutné provést samotnou dehydrataci, mohlo by být do budoucna využito ke stanovení žlučových kyselin průtokových analýz s elektrochemickou detekcí. Další výzkumy by tedy mohly být věnovány optimalizaci separačních podmínek.

6 POUŽITÁ LITERATURA

[

[1] M. Vecka, A. Žák, B. Staňková, Š. Fojtíková, P. Tomášková, S. Kutová, Žlučové kyseliny – malé molekuly velkých možností. 113, č. 2, 2019, *Chemické listy*, stránky 82–89.

[2] J. Klouda, K. Nesměrák, P. Kočovský, J. Barek, K. Schwarzová, A novel voltametric approach to the detection of primary bile acids in serum samples. Praha, *Biochemistry*, 2020, Sv. 134.

[3] A. F. Hofmann, L. R. Hagey, Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics. 2008, *Cellular and Molecular Life Sciences*, stránky 2461–83.

[4] M. Dutta, J. Cai, W. Gui, A review of analytical platforms for accurate bile acid measurement. 411, 2019, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, stránky 4541–4549.

[5] J. Klouda, Elektrochemická oxidace žlučových kyselin na elektrodách na bázi uhlíku. Možnosti využití v elektroanalýze. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha, 2015.

[6] K. Jelšíková, Vývoj elektroanalytických metod pro detekci žlučových kyselin obsahujících 7 α hydroxylovou skupinu. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha, 2020.

[7] A. F. Hofmann, Bile acids: Trying to understand their chemistry and biology with the hope of helping patients. 49, *Hepatology*, stránky 1403-1418.

[8] D. G. Guzion, R. A. Quinn, Review: microbial transformations of human bile acids. *Microbiome*, 2021, Sv. 140.

[9] T. Vasavan, E. Ferraro, E. Ibrahim, P. Dixon, J. Gorelik, C. Williamson, Heart and bile acids – Clinical consequences of altered bile acid metabolism. 2018, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, stránky 1345-1355.

[10] S. Mukhopadyay, U. Maitra. Chemistry and biology of bile acids. 12, *Current Science*, 2004, Sv. 87, stránky 1666 - 1683.

[11] M. Alvarez, A. Jover, J. Carrazana, F. Mejjide, V. H. Soto, J. Tato, Crystal

structure of chenodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid and their two 3beta, 7alpha- and 3beta,7 beta-dihydroxy epimers. *Steroids*, 2007, Sv. 72, stránky 535 - 574.

[12] M. J. Armstrong, M. C. Carey, The hydrophobic-hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities. *Journal of Lipid Research*, 1982, Sv. 23, stránky 70 - 80 .

[13] A. Hofmann, A. Roda, Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *Journal of Lipid Research*, 1984, Sv. 13, stránky 1477-1489.

[14] A. Hofmann, K. Mysels, Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH and Ca²⁺ ions. San Diego : *Journal of lipid research*, 1992, Sv. 33, stránky 617-626.

[15] G. Jenkins, L. J. Hardie. Bile Acids: Toxicology and bioactivity. *Cambridge : The Royal Society of Chemistry*, 2008.

[16] J. Klouda, J. Barek, K. Nesměrāk, K. Schwarzová-Pecková, Non-enzymatic electrochemistry in characterization and analysis of steroid compounds. *Critical reviews in analytical Chemistry*, 2017, Sv. 47, stránky 384-404.

[17] K. Pecková, K. Nesměrāk, Electrochemistry of bile acids, cholesterol, and related compounds (An Overview). Pardubice : *Sensing in electroanalysis*, 2012, Sv. 7, stránky 87-96.

[18] T. Ferri, L. Campanella, G. De Angelis, Differential-pulse polarographic determination of cholic acids. *Analyst*, 1984, stránky 923-925.

[19] P. Yershova, Studium redoxních a adsorpčních vlastností žlučových kyselin na rtuťové visící kapkové elektrodě. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha, 2020.

[20] D. Hulová, Využití elektrodových materiálů na bázi rtuti ke studiu elektrochemické redukce vybraných žlučových kyselin. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha 2015.

[21] A. Patáková, Elektrochemická redukce dehydrocholové a chenodeoxycholové kyseliny na stacionárních rtuťových a amalgámových elektrodách . Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha, 2016.

[22] Š. Rákosníková, Studium elektrochemické redukce kyseliny deoxycholové a

ursodeoxycholové a rtuťové visící kapkové elektrodě. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha, 2014.

[23] K. Pišňová, Využití rtuťových elektrod ke stanovení kyseliny tauroursodeoxycholové. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha, 2013.

[24] J. Klouda, J. Barek, P. Kočovský, T. Herl, F. M. Matysik, K. Nesměrák, K. Schwarzová-Pecková, Bile acids: Electrochemical oxidation on bare electrodes after acid-induced dehydration, 2018, *Electrochemistry Communications*, stránky 99 - 103.

[25] X. Zhang, M. Zhu, B. Xu, Y. Cui, G. Tian, Z. Shi, M. Ding, Indirect electrochemical detection for total bile acids in human serum. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, Sv. 85, stránky 563-567.

[26] K. J. McLean, M. Hans, A. W. Munro, Cholesterol, an essentials molecule: diverse roles involving cytochrome P450 enzymes. *Bohemian soc. Trans.*, 2012, Sv. 40, stránky 587-593.

[27] G. Lorbek, M. Lewinska, D. Rozman, Cytochrome P450s in the synthesis of cholesterol and bile acids – from mouse models to human diseases. *The FEBS Journal*, 2012, Sv. 279, stránky 1516-1533.

[28] F. S. Ferdinandusse, Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis. *Molecular aspects of Medicine*, 2017, Sv. 56, stránky 10-24.

[29] T. Li, J. Y. L. Chiang, Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. *PPAR Research*, 2009.

[30] J. Y. L. Chiang, J. M. Ferrell, Bile Acid Metabolism in Liver Pathobiology. *Gene Expression*, 2018, Sv. 18, stránky 71-87.

[31] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 221493, Cholic acid.

[32] J. L. Bennion, R. L. Ginsberg, B. Garnick, P. H. Bennett, Effects of Oral Contraceptives on the Gallbladder Bile of Normal Women. *The New England journal of medicine*, 1976, Sv. 294, stránky 189-192.

[33] National Center for Biotechnology Information (2023). *PubChem Compound Summary for CID 10133*, Chenodeoxycholic acid.

[34] S. M. Anwer, Cellular regulation of hepatic bile acid transport in health and

cholestasis. *Hepatology*, 2004, Sv. 39, stránky 581-590.

[35] National Center for Biotechnology Information (2023). *PubChem Compound Summary for CID 10140*, Glycocholic acid.

[36] Taurochenodeoxycholic Acid. *National Library of Medicine*, 1991.

[37] V. Dosedělová, P. Itterheimová, P. Kubáň. Analysis of bile acids in human biological samples by microcolumn separation techniques: A review. *Electrophoresis*, 2021, Sv. 42, stránky 68-85.

[38] S. D. Turley, J. M. Dietschy. Re-evaluation of the 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. *Journal of Lipid Research*, 1987, stránka 924.

[39] J. Kandrak, S. Kevresan, K. Guj, M. Mikov, J. P. Fawcett, K. Kuhajda. Isolation and determination of bile acids. *European journal od drug and metabolism and pharmacokinetics*, 2006, Sv. 31, stránky 157-177.

[40] A. Pyka, M. Dolowy. Separation of Selected Bile Acids by TLC. II. One-Dimensional and Two-Dimensional TLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* , 2004, Sv. 27, stránky 2031-2038.

[41] G. Kakiyama, A. Muto, H. Takei, H. Nittono, T. Murai, T. Kurosawa, A. F. Hofmann, W. M. Pandak, J. S. Bajaj. A simple and accurate HPLC method for fecal bile acid profile in healthy and cirrhotic subjects: validation by GC-MS and LC-MS. *Journal of Lipid Research*, 2014, Sv. 55, stránky 978 - 990.

[42] R. Mahara, H. Takeshita, T. Kurosawa. Determination of 1 β -Hydroxylated Bile Acids and Related Compounds in Human Biological Fluids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical sciences*, 1987, stránky pages 449–452.

[43] A. K. Batta, G. Salen. Gas chromatography of bile acids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998, Sv. 723, stránky 1-16.

[44] J. H. T. Luong, K. B. Male, J. D. Glennon. Boron-doped diamond electrode : Synthesis, characterization, functionalization and analytical applications. *Analyst*, 2009, Sv. 134, stránky 1965-1979.

[45] K. Muzyka, J. Sun, T. H. Fereja, Y. Lan, W. Zhang, G. Xu. Boron-doped diamond: current progress and challenges in view of electroanalytical applications. *Royal*

Society of Chemistry, 2019, Sv. 11, stránky 397-414.

[46] J. Musilová, J. Barek, K. Pecková. Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek. Praha : *Chemické listy*, 2009, Sv. 103, stránky 469-478.

[47] H. B. Suffredini, S. A. S. Machado, L. A. Avaca. The water decomposition reactions on boron-doped diamond electrodes. Sao Paulo : *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2004, Sv. 15, stránky 16-21.

[48] J. Klouda, K. Nesměrák, P. Kočovský, J. Barek, a K. Schwarzová-Pecková. A Novel Voltammetric Approach to the Detection of Primary Bile Acids in Serum Samples, Amsterdam, 2020, *Bioelectrochemistry*, str. 107 - 539.

[49] L. Fojtíková, S. G'oselová, B. Holubová. Anabolické androgenní steroidy - nebezpečí v doplňcích stravy. Praha : *Chemické Listy*, 2015, Sv. 109, stránky 913-917.