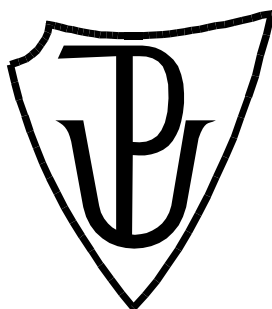


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie



**Studium a analytické využití elektrochemických  
přeměn žlučových kyselin**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Viktor Chromý</b>
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí práce:	<b>RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.</b>

2021 Olomouc

### Prohlášení

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

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

Podpis

## Bibliografická identifikace

Autor	Bc. Viktor Chromý
Název práce	Studium a analytické využití elektrochemických přeměn žlučových kyselin
Typ práce	Diplomová práce
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	Diplomová práce se zabývá vývojem metody elektrochemické detekce a stanovení žlučových kyselin a jejich konjugátů po jejich HPLC separaci. Pro tuto detekci byly nejprve voltametricky testovány dvě elektrody, a to elektroda ze skelného uhlíku a borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE). Jako vhodnější byla zvolena BDDE. Vyvinutá metoda zahrnuje dehydrataci žlučových kyselin kyselinou chloristou v acetonitrilu, při níž vznikají elektroaktivní deriváty. Metodou se podařilo úspěšně separovat a amperometricky detekovat kyseliny cholovou, chenodeoxycholovou, taurochenodeoxycholovou, taurocholovou a glykocholovou v jejich směsi. Meze amperometrické detekce se pohybují v řádu jednotek $\mu\text{mol/l}$ a jsou srovnatelné s UV detekcí.
Klíčová slova	Žlučové kyseliny, elektrochemická detekce.
Počet stran	51
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Autor	Bc. Viktor Chromý
Title	Study and analytical use of electrochemical transformations of bile acids
Type of thesis	Master's thesis
Department	Department of Analytical Chemistry
Supervisor	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	<p>This thesis deals with the development of a method for electrochemical detection and quantification of bile acids and their conjugates after HPLC separation. First, two working electrodes - glassy carbon electrode and boron doped diamond electrode (BDDE) - were tested for this detection method by voltammetry. BDDE was chosen as a more suitable electrode. The developed method involves the dehydration of bile acids with perchloric acid in acetonitrile to give electroactive derivatives. Cholic, chenodeoxycholic, taurochenodeoxycholic, taurocholic and glycocholic acids were successfully separated and amperometrically detected in their mixture. The limits of amperometric detection are in units of <math>\mu\text{mol/l}</math> and are comparable to UV detection.</p>
Keywords	Bile acids, electrochemical detection
Number of pages	51
Language	Czech

## **Poděkování:**

Rád bych poděkoval vedoucí mé práce RNDr. Janě Skopalové Ph.D. za pomoc a ochotu při zpracovávání tématu této práce a také při jejím sepsování, předané zkušenosti a rady. Také bych chtěl poděkovat Mgr. Radku Jergovi za pomoc při práci v laboratoři ale i mimo ni. Dále bych chtěl poděkovat rodičům, rodině a obzvláště své mamince za trpělivost a podporu po celou dobu mého studia. V neposlední řadě bych také poděkoval katedře analytické chemie.

Tato závěrečná práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (projekt IGA\_PrF\_2020\_030 a IGA\_PrF\_2021\_021) a Grantovou agenturou České republiky (projekt 19-11268S).

# OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>7</b>
<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
1.1 ŽLUČOVÉ KYSELINY .....	10
1.1.1 Fyziologie žlučových kyselin .....	10
1.1.1.1 Biologické funkce .....	10
1.1.1.2 Syntéza žlučových kyselin .....	11
1.1.1.3 Konjugáty žlučových kyselin .....	13
1.1.1.4 Patofyziologie žlučových kyselin .....	13
1.1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti žlučových kyselin .....	14
1.1.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti jednotlivých kyselin a jejich konjugátů .....	16
1.2 ANALÝZA ŽLUČOVÝCH KYSELIN A JEJICH KONJUGÁTŮ .....	18
1.2.1 Stanovení žlučových kyselin pomocí GC-MS, HPLC-MS a dalších HPLC metod .....	18
1.2.2 Stanovení žlučových kyselin pomocí elektroanalytických metod .....	21
<b>2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>26</b>
2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	26
2.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	26
2.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ .....	27
2.3.1 Příprava zásobních roztoků standardů .....	27
2.3.2 Příprava roztoků pro voltametrii .....	27
2.3.3 Příprava roztoků pro HPLC analýzu .....	28
2.4 VOLTAMETRIE .....	29
2.4.1 Diferenční pulzní voltametrie .....	29
2.5 HPLC ANALÝZA .....	29
<b>3 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>31</b>
3.1 VLIV OBSAHU VODY NA VOLTAMETRICKOU ODEZVU ŽLUČOVÝCH KYSELIN .....	31
3.2 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST PRO METODU DPV .....	32
3.3 HPLC SEPARACE ŽLUČOVÝCH KYSELIN A KONJUGÁTŮ S UV A AMPEROMETRICKOU DETEKČÍ .....	36
3.3.1 UV detekce .....	37
3.3.2 Hydrodynamické voltamogramy analyzovaných látek .....	37
3.3.3 Vliv doby dehydratace na intenzitu signálu UV a amperometrického detektoru .....	39
3.3.4 Kalibrační závislosti .....	41
3.3.5 Měření látek ve směsi .....	44
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>46</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>48</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CA	Cholová kyselina	Cholic acid
CDCA	Chenodeoxycholová kyselina	Chenodeoxycholic acid
GC	Plynová chromatografie	Gas chromatography
MS	Hmotnostní spektrometrie	Mass spectrometry
UDCA	Ursodeoxycholová kyselina	Ursodeoxycholic acid
ESI	Ionizace elektrosprejem	Electrospray ionization
LC	Kapalinová chromatografie	Liquid chromatography
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	High performance liquid chromatography
SPE	Extrakce pevnou fází	Solid phase extraction
BDDE	Borem dopovaná diamantová elektroda	Boron doped diamond electrode
GCE	Elektroda ze skelného uhlíku	Glassy carbon electrode
ACN	Acetonitril	Acetonitrile
LOD	Mez detekce	Limit of detection
LOQ	Mez stanovitelnosti	Limit of quantification
DPV	Diferenční pulzní voltametrie	Differential pulse voltammetry
T-CA	Taurocholová kyselina	Taurocholic acid
T-CDCA	Taurochenodeoxycholová kyselina	Taurochenodeoxycholic acid
G-CA	Glykocholová kyselina	Glycocholic acid
G-CDCA	Glykochenodeoxycholová kyselina	Glykochenodeoxycholic acid
ECD	Elektrochemický detektor	Electrochemical detector
RP	Reverzní fáze	Reverse phase

## ÚVOD

Žlučové kyseliny mají v těle mnoho funkcí a nejdůležitější z nich je emulgace a absorpce tuků a vitamínů rozpustných v tucích z potravy do těla. Defekty v jejich syntéze způsobují cholestatické poruchy, a to převážně u dětí. Další skupinou lidí s poruchou metabolismu žlučových kyselin jsou lidé trpící cirhózou jater. Pro včasnou diagnózu a úspěšné léčení těchto poruch jsou nezbytné vhodné analytické metody.

Obvykle používanými metodami pro analýzu žlučových kyselin jsou GC-MS a HPLC-MS. Tyto techniky mají výhodu velice účinné separace a vysoce selektivní detekce, avšak jsou to techniky drahé a náročné. Další možností je separace pomocí HPLC s UV detekcí. U toho způsobu detekce je nevýhodou absence chromoforu ve struktuře žlučových kyselin, které proto poměrně slabě absorbují elektromagnetické záření, a to převážně až u vlnových délek okolo 200 nm a kratších. Dalšími používanými technikami jsou enzymatické a fluorimetrické metody, metody radioimunoanalýzy a bioluminiscence. Lze také použít MS s přímým nástřikem. Elektroanalytické metody, zejména citlivé voltametrické a amperometrické techniky, by mohly být poměrně levnou alternativou pro detekci a stanovení žlučových kyselin.

I když jsou žlučové kyseliny látky, které nejsou elektrochemicky aktivní, Klouda et al. [1] vyvinuli metodu využívající dehydratace žlučových kyselin pomocí kyseliny chloristé, která umožňuje jejich elektrochemickou oxidaci. Díky této metodě přípravy vzorků je tedy možné analyzovat tyto látky metodami elektrochemické analýzy.

Tato práce, která je součástí širšího výzkumného projektu věnujícího se studiu elektrochemických přeměn steroidních látek, navazuje na dosud známé poznatky o elektrochemickém chování žlučových kyselin. Zabývá se elektrochemickou oxidací žlučových kyselin na dvou pracovních elektrodách, a to na elektrodě ze skelného uhlíku a borem dopované diamantové elektrodě. Jejím hlavním cílem bylo prozkoumat možnosti analytického využití tohoto procesu k elektrochemické detekci cholové a chenodeoxycholové kyseliny, včetně jejich

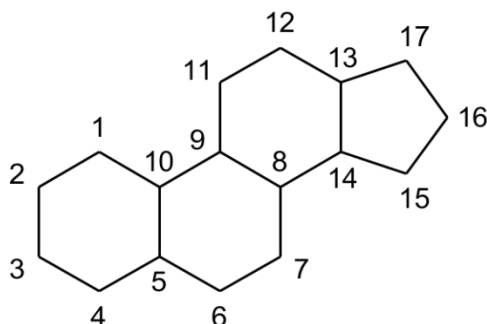


konjugátů s taurinem a glycinem, a vyvinout metodu pro analýzu těchto látek pomocí kapalinové chromatografie s amperometrickou detekcí.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny jsou látky steroidní povahy přirozeně se vyskytující v tělech savců a dalších obratlovců. Tyto látky jsou produkty metabolismu cholesterolu, kdy je tento špatně rozpustný membránový lipid přeměňován na ve vodě rozpustnější amfipatické látky. Základní molekulou, od níž se odvozuje struktura všech steroidních látek, je steran (cyklopentanoperhydrofenanthren, obr. 1). V případě žlučových kyselin se na uhlících C<sub>10</sub> a C<sub>13</sub> nacházejí methylové skupiny a na uhlíku C<sub>17</sub> se nachází různě dlouhý postranní řetězec. Žlučové kyseliny se dělí na dvě skupiny, a to C<sub>24</sub> žlučové kyseliny, které jsou označovány jako “moderní“ žlučové kyseliny a C<sub>27</sub> žlučové kyseliny, označované jako “primitivní“ žlučové kyseliny. Tato označení jim byla přidělena podle toho, u jakých živočichů se nacházejí. C<sub>27</sub> žlučové kyseliny se vyskytují převážně u ryb a obojživelníků, ale také u plazů a některých evolučně starších druhů ptáků. C<sub>24</sub> žlučové kyseliny se vyskytují u všech obratlovců, ale nejvíce se jich nachází u savců [2,3].



Obrázek 1 Strukturální vzorec steranu

### 1.1.1 Fyziologie žlučových kyselin

#### 1.1.1.1 *Biologické funkce*

Žlučové kyseliny jsou tradičně považovány za látky významné pro trávení tuků, jejichž funkcí je pomoci při emulgaci a absorpci tuků a vitamínů rozpustných v tucích. V poslední době se tyto látky ukazují být daleko všestrannější, než se dříve věřilo. Bylo zjištěno, že se účastní mnoha dalších procesů.

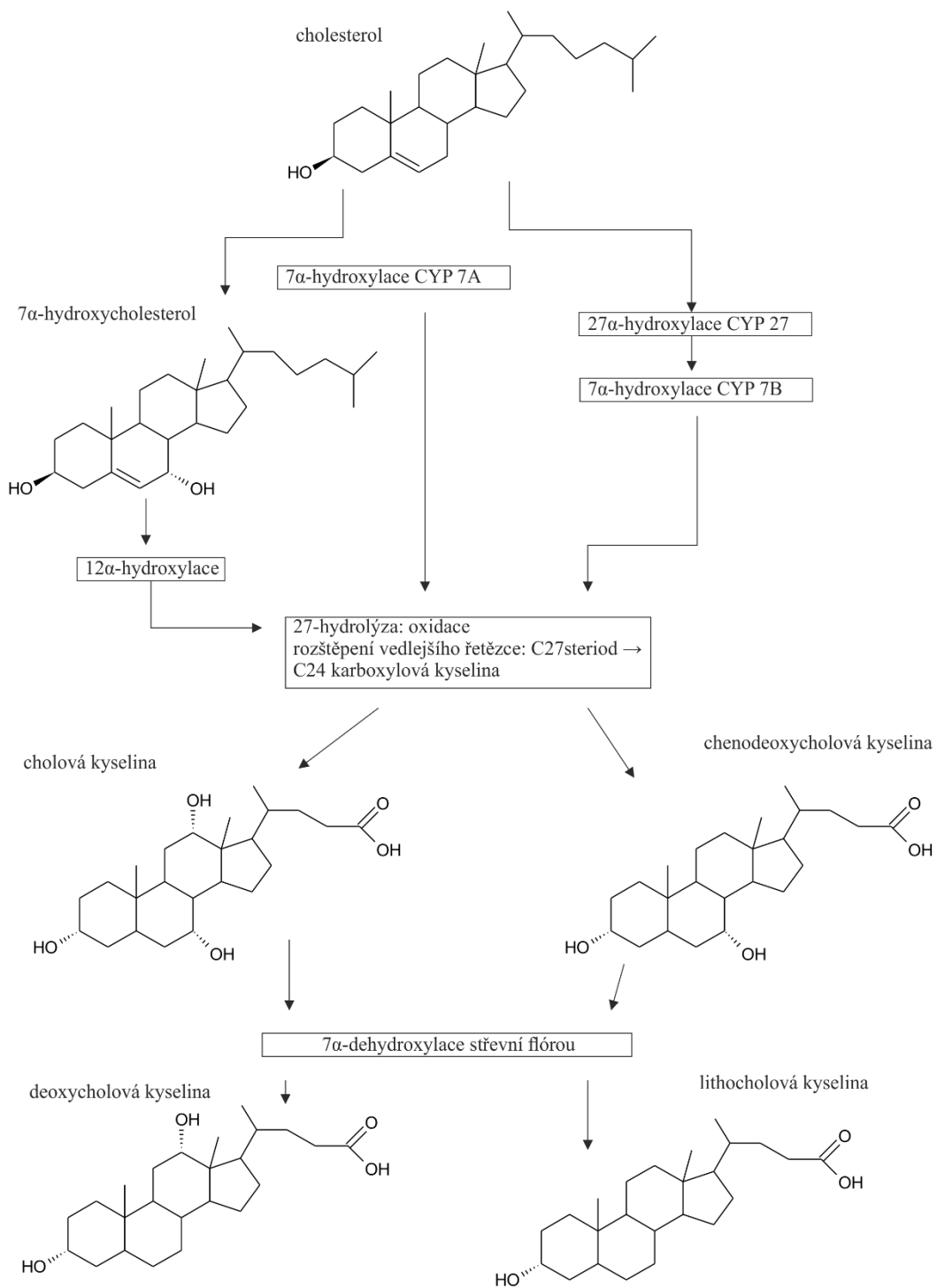
Sekrece žlučových kyselin do žlučových kanálků generuje osmotický tlak, který odpovídá za frakci žlučového toku závislého na žlučových kyselinách [4]. Žlučové kyseliny stimulují sekreci žlučových lipidů a v důsledku svých fyzikálně chemických vlastností jsou schopny tvořit smíšené micely společně se žlučovými fosfolipidy, což umožňuje rozpustnost cholesterolu a jiných lipofilních látek ve žluči. Tyto smíšené micely jsou také odpovědné za emulgování stravitelných tuků a vitamínů rozpustných v tucích ve střevech, čímž podporují jejich absorpci. Žlučové kyseliny zajišťují ve střevech další funkce, jako je například absorpce vápníku [5], regulace sekrece pankreatických enzymů a uvolňování cholecystokininu [6]. Dále jsou to také potentní antimikrobiální látky, které zabraňují přemnožení bakterií v tenkém střevě [7]. S objevem specifických receptorů, jako jsou „farnesoid X receptor“ (FRX) [8] nebo membránový receptor TGR5 [9], je evidentní role žlučových kyselin jakožto signálních molekul s důležitou parakrinní a endokrinní funkcí [10].

#### ***1.1.1.2 Syntéza žlučových kyselin***

Žlučové kyseliny jsou syntetizovány z cholesterolu. Dvě hlavní biosyntetické cesty, takzvaná „klasická“ a „alternativní“ cesta, odpovídají za formování žlučových kyselin. Byly popsány i méně důležité dráhy, jež u některých živočichů nebo situací mohou mít také svou relevanci [11].

Klasická cesta, také známá jako „neutrální“ cesta, jelikož jejími produkty jsou neutrální steroly, se uskutečňuje pouze v játrech a syntetizuje dvě u lidí nejvíce se vyskytující žlučové kyseliny, a to kyselinu cholovou (CA) a kyselinu chenodeoxycholovou (CDCA). Tato dráha se skládá z kaskády reakcí katalyzovaných pomocí enzymů nacházejících se v cytosolu, mikrozomech, mitochondriích a peroxizomech [12,13]. Mechanismus této syntézy znázorňuje obr. 2.

Z těchto primárních žlučových kyselin vznikají ve střevech bakteriální degradací sekundární žlučové kyseliny. Z cholové kyseliny vzniká deoxycholová kyselina a z chenodeoxycholové kyseliny lithocholová [14].



Obrázek 2 Mechanismus syntézy žlučových kyselin [14]

### **1.1.1.3 Konjugáty žlučových kyselin**

C<sub>24</sub> žlučové kyseliny jsou konjugovány v játrech s glycinem nebo taurinem. Pro běžné přírodní žlučové kyseliny se používají dva typy pojmenování. Starším názvem byl taurocholát a novější, chemicky správnější by byl cholyltaurin [15]. Výsledkem konjugace s taurinem je formace molekuly, která je plně ionizovaná (pK 2) a dobře rozpustná ve vodě při pH tenkého střeva v průběhu trávení (pH 6-7). Důležité je, že pro negativně nabitý konjugát jsou buněčné membrány nepropustné. Navíc molekula žlučové soli je příliš velká na to, aby difundovala skrz paracelulární spojení žlučových cest a tenkého střeva. Tato nepropustnost je klíčovým faktorem v propagaci vysoké koncentrace konjugovaných žlučových kyselin ve žlučových cestách a tenkém střevě.

Konjugací C<sub>24</sub> žlučových kyselin s glycinem jsou konvertovány slabé kyseliny (pK<sub>a</sub> 5) na lehce silnější kyseliny (pK<sub>a</sub> 4). Výsledkem je zvýšená rozpustnost a ionizace při pH a podmínkách převažujících při trávení [16].

### **1.1.1.4 Patofyziologie žlučových kyselin**

Defekty v syntéze žlučových kyselin nejsou příliš běžnou genetickou poruchou, jež zodpovídá za asi 1–2 % cholestatických poruch u dětí [17]. Dědičnost těchto poruch je autosomálně recesivní. Výsledná onemocnění jater mohou být mírná až těžká v závislosti na konkrétní poruše. Nejčastějším klinickým projevem je progresivní cholestáza u kojenců, i když se mohou objevovat i jiné klinické projevy jako například pokročilé onemocnění jater po narození, novorozenecká hepatitida nebo vývoj onemocnění v pozdějším dětství. Pokud enzymatický defekt způsobí akumulaci toxických monohydroxylovaných a / nebo nenasycených oxo-žlučových kyselin, z nichž mnoho působí cholestaticky, je progresse onemocnění jater obvykle rychlá [18]. Nedávné výzkumy naznačují, že cholestatická onemocnění u dospělých mohou být způsobena dědičnými poruchami v biosyntéze žlučových kyselin [19].

Diagnóza se provádí pomocí analýzy profilu druhů žlučových kyselin a jejich prekurzorů a / nebo metabolitů v tělních tekutinách pomocí laboratorních technik hmotnostní spektrometrie s ionizací urychlenými atomy (FAB-MS) a GC-MS. Včasná diagnóza je pro tyto pacienty zásadní, protože některé z těchto poruch lze úspěšně vyléčit pomocí dietárního přidání žlučových kyselin. Toto má dvojí

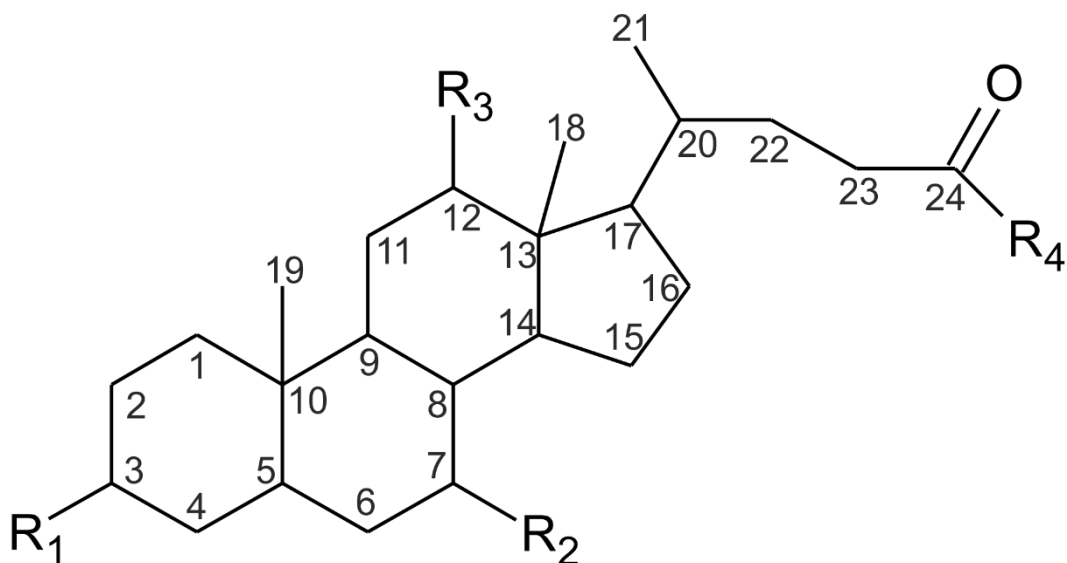
účel: zaprvé nahrazení chybějících esenciálních žlučových kyselin a za druhé regulace syntézy žlučových kyselin negativní inhibicí zpětné vazby, čímž se snižuje produkce abnormálních toxických meziproductů produkovaných hepatocyty nesoucími vadu.

Tyto vrozené vady ovlivňují enzymy, které se účastní jak modifikace steroidního jádra, postranního řetězce, tak také amidace postranního řetězce. Navíc zhoršená funkce peroxizomů také vede ke změnám v metabolismu žlučových kyselin, které doprovází další znaky charakterizující každý syndrom [20].

Další z nemocí, jež ovlivňuje složení žlučových kyselin ve žluči, je cirhóza jater. U pacientů trpících cirhózou jater bylo zjištěno, že se v jejich žluči vyskytuje výrazně méně sekundárních žlučových kyselin. Příčina tohoto jevu nebyla dosud objasněna. Nedostatek sekundárních žlučových kyselin se pravděpodobně výrazně projevuje také na střevním mikrobiomu [21].

### **1.1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti žlučových kyselin**

Žlučové kyseliny jsou vždy substituovány na uhlíku  $C_{17}$  postranním řetězcem s karboxylovou skupinou. Délka tohoto řetězce se může lišit v závislosti na tom, zdali se jedná o  $C_{24}$  nebo  $C_{27}$  žlučovou kyselinu. Dále tyto kyseliny bývají typicky substituovány na uhlících  $C_3$ ,  $C_7$  a  $C_{12}$ . Substituenty na těchto uhlících jsou buďto hydroxylové nebo alkylové skupiny (obr. 3, substituenty  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  a  $R_4$ ). V některých případech mohou být tyto substituenty i na jiných uhlících jako například na uhlíku  $C_6$  u muricholové kyseliny. Tyto látky se vyskytují však jen velmi výjimečně [22].



Obrázek 3 Chemická struktura  $C_{24}$  žlučové kyseliny

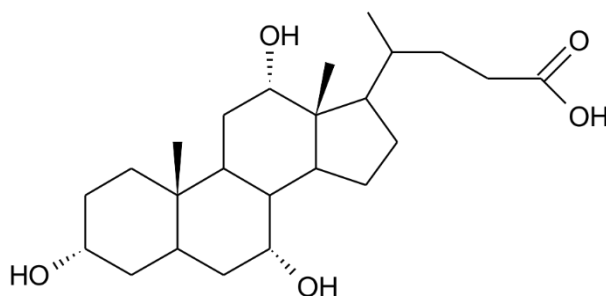
Přítomnost neekvivalentních hydroxylových skupin v žlučových kyselinách (u savců běžně na uhlících  $C_3$ ,  $C_7$  a  $C_{12}$ ) a postranní řetězec nesoucí karboxylovou skupinu jim dává zvláštní fyzikálně-chemické vlastnosti [20], jež je činí velmi lákavými stavebními kameny s dopady na design nových antibiotik [23], chirálních templátů [24], nových měkkých materiálů [25,26], kationtových [27] a aniontových [28,29] receptorů, umělých iontových kanálů [30], nosičů léků s cíleným uvolňováním [31], molekulárních košů [32], nových povrchově aktivních látek [33] a dalších [34].

Mezi nejdůležitější fyziologické funkce žlučových kyselin patří transport lipidů z trávicího traktu, z něhož se špatně absorbují. Tyto funkce souvisejí s jejich amfipatickou povahou, kterou mají díky existenci hydrofilní strany ( $\alpha$ -část, konkávní spodní strana) a hydrofobní strany ( $\beta$ -část, konvexní horní strana). Hydroxylové skupiny orientované směrem k  $\alpha$ -straně (s výjimkou běžně se vyskytující UDCA se  $7\beta$ -OH skupinou) a postranní karboxylový řetězec poskytují žlučovým kyselinám jejich hydrofilní vlastnosti. Hydrofobní methylové skupiny na uhlících  $C_{10}$  a  $C_{13}$  (jsou označeny jako  $C_{18}$  a  $C_{19}$ ) jsou orientovány směrem k  $\beta$ -straně [35]. V důsledku těchto strukturních vlastností projevují žlučové kyseliny velkou povrchovou aktivitu ve vodných roztocích. Pokud je jejich koncentrace vyšší než kritická micelární koncentrace, tvoří malé agregáty nebo micely většinou

menší než 10 nm. Pokud je jejich koncentrace nižší než tato kritická hodnota, tak se žlučové kyseliny chovají jako silné elektrolyty [36].

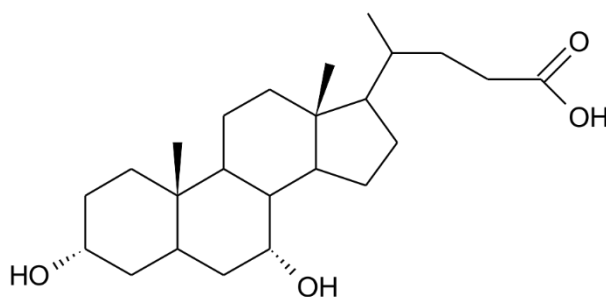
### 1.1.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti jednotlivých kyselin a jejich konjugátů

**Cholová kyselina** (obr. 4) je bílá až béžová krystalická pevná látka. Bod tání je 198 °C. Rozpustnost ve vodě 175 mg/l při 20 °C. Dobře je tato kyselina rozpustná v ethanolu (30,56 g/l), acetonu (28,24 g/l) a obzvláště v ledové kyselině octové (152,12 g/l) při 15 °C. Sumární vzorec je  $C_{24}H_{40}O_5$ , molární hmotnost 408,6 g/mol [37,38].



Obrázek 4 Strukturální vzorec cholové kyseliny

**Chenodeoxycholová kyselina** (obr. 5) je bílá nebo špinavě bílá pevná krystalická látka. Bod tání je 168-171 °C. Rozpustnost ve vodě je 89,9 mg/l při 20 °C. Lépe se rozpouští v alkoholech a ledové kyselině octové. Sumární vzorec je  $C_{24}H_{40}O_4$ , molární hmotnost 392,6 g/mol [39,40].

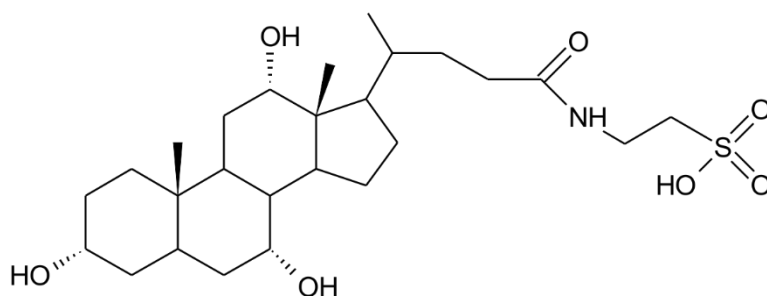


Obrázek 5 Strukturální vzorec chenodeoxycholové kyseliny

**Taurocholová kyselina** (obr. 6) je bílá nebo špinavě bílá pevná krystalická látka. Bod tání je 125 °C. Tento konjugát cholové kyseliny je dobře rozpustný ve vodě a ethanolu a špatně rozpustný v etheru a ethylacetátu. Sumární vzorec je

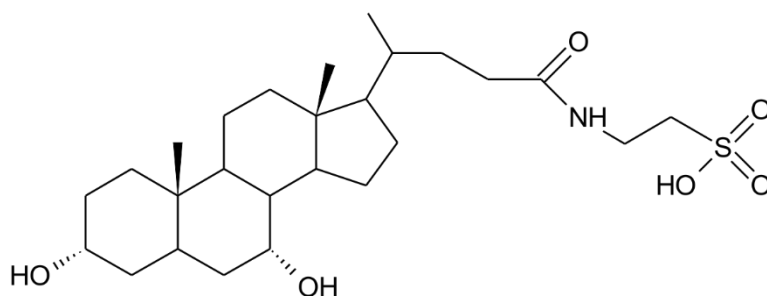


$C_{26}H_{45}NO_7S$ , molární hmotnost je 515,7g/mol. Běžně se vyskytuje jako sodná sůl [41,42].



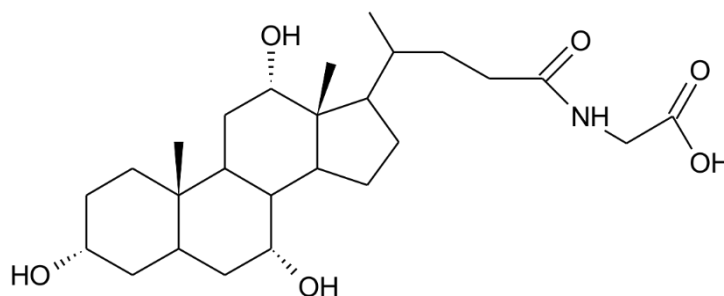
Obrázek 6 Strukturální vzorec taurocholové kyseliny

**Taurochenodeoxycholová kyselina** (obr. 7) je bílá nebo špinavě bílá pevná látka. Její sumární vzorec je  $C_{26}H_{45}NO_6S$ , molární hmotnost je 499,7 g/mol. Vyskytuje se také jako sodná sůl [43,44].



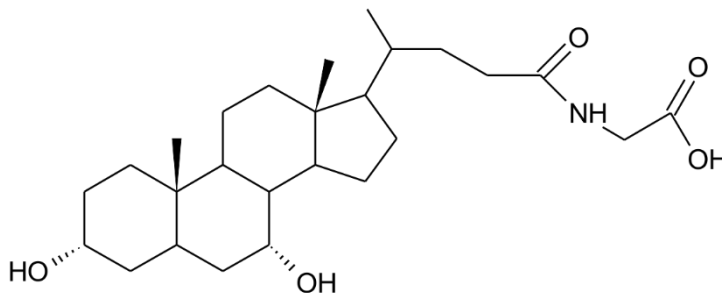
Obrázek 7 Strukturální vzorec taurochenodeoxycholové kyseliny

**Glykocholová kyselina** (obr. 8) je bílá nebo špinavě bílá pevná látka. Bod tání je 166,5°C. Sumární vzorec je  $C_{26}H_{43}NO_6$ , molární hmotnost je 465,6 g/mol. Může se vyskytovat ve formě sodné soli [45,46].



Obrázek 8 Strukturální vzorec glykocholové kyseliny

**Glykochenodeoxycholová kyselina** (obr. 9) je bílá pevná látka. Její sumární vzorec je  $C_{26}H_{43}NO_5$ , molární hmotnost je 449,6 g/mol. Obvykle se vyskytuje ve formě sodné soli [47,48].



Obrázek 9 Strukturní vzorec glykochenodeoxycholové kyseliny

## 1.2 Analýza žlučových kyselin a jejich konjugátů

Pro stanovení žlučových kyselin bylo v minulosti vyvinuto mnoho metod. Dříve byly často používány metody enzymatické a fluorimetrické [49]. Dále je také možno využít metod radioimunoanalýzy [50,51], bioluminiscence [52] nebo ESI-MS s přímým nástřikem [53]. Dnes nejvíce rozšířenými metodami jsou GC-MS a HPLC-MS metody, ale také HPLC metody s jinou než MS detekcí. Těmto metodám je věnována následující podkapitola.

### 1.2.1 Stanovení žlučových kyselin pomocí GC-MS, HPLC-MS a dalších HPLC metod

Pro analýzu komplexních biologických vzorků je v závislosti na obsahu žlučových kyselin a biologické matrici první volbou metoda HPLC-MS. V současnosti většina HPLC-MS a HPLC-MS/MS metod pro analýzu žlučových kyselin využívá chromatografie na reverzních fázích a ionizaci za atmosférického tlaku. Mohou být použity různé typy kolon od běžně užívaných kolon pro HPLC analýzy po kolony pro ultra účinnou kapalinovou chromatografii (UPLC).

Další metodou pro analýzu žlučových kyselin je HPLC s jinou než hmotnostní detekcí. Jako detekční metodu lze použít UV spektrometrii, vhodným detektorem je také odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD).

Historicky byly GC a GC-MS nejčastěji používanými metodami pro analýzu a profilování žlučových kyselin. Avšak s příchodem HPLC-MS metod se význam GC-MS snížil, a to obzvláště u rutinních aplikací. To je způsobeno hlavně potřebou derivatizace žlučových kyselin. Avšak GC-MS má důležitou výhodu oproti HPLC-MS v lepší selektivitě analýzy komplexních směsí nekonjugovaných žlučových kyselin. Lze tedy říci, že tyto metody jsou komplementární [53].

Setchell a Matsui [54] vyvinuli metodu stanovení žlučových kyselin a jejich konjugátů pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Popsaný postup zahrnuje několik metod přípravy vzorku. Jednak popisuje metodu vhodnou pro stanovení celkového množství žlučových kyselin, dále metodu pro stanovení jen nekonjugovaných žlučových kyselin a rovněž metodu pro stanovení konjugátů žlučových kyselin. Analyzované látky byly následně derivatizovány na trimethylsilyletherové deriváty přidávkem směsi pyridinu : hexamethyldichlorsilanu : trimethylchlorsilanu (v objemovém poměru 3 : 2 : 1) a zahřátím na 60 °C po dobu 15ti minut. Po této derivatizaci byl vzorek analyzován na 25 m dlouhé křemenné kapilární koloně pokryté silikonem OV-1. Jako nosný plyn bylo použito helium o průtoku 2,5 ml/min. Teplotní program byl nastaven od 220-270 °C s gradientem 2 °C/min. Byla použita elektronová ionizace s teplotou iontového zdroje 250 °C a energií elektronů 70 eV. Mez detekce pro žlučové kyseliny v séru je průměrně 0,01 μmol/l a citlivost této metody je srovnatelná s radioimunoanalýzou. Návratnost této metody je minimálně 93,8 ± 3 %.

Alnouti et al. [55] popisují metodu analýzy žlučových kyselin pomocí LC-MS/MS, kde byl použit Waters ACQUITY UPLC systém a jako detektor byl použit Waters Quattro Premier XE trojitý kvadrupol s ESI iontovým zdrojem. Všechny chromatografické separace byly provedeny na UPLC C<sub>18</sub> koloně. Mobilní fáze se skládala z 5 % acetonitrilu (ACN) v methanolu (MeOH) (mobilní fáze A) a 7,5 mmol/l octanu amonného upraveného na pH 4 pomocí 10 mol/l kyseliny octové (mobilní fáze B) s celkovým průtokem 0,3 ml/min. Důvod pro volbu pH 4 byl ten, že při tomto pH měly jednotlivé konjugáty a nekonjugovaná forma rozdílné retenční časy a zároveň byla nejvyšší intenzita signálu detektoru. Konjugáty s glycinem byly pozorovány v pozitivním ionizačním módu, zatímco konjugáty s taurinem a nekonjugované žlučové kyseliny byly detekovány v negativním módu. Meze

detekce pro různé žlučové kyseliny byly 2 – 5 ng/ml, mez stanovitelnosti pro konjugáty s glycinem byla 10 ng/ml, pro konjugáty s taurinem 40 ng/ml a pro nekonjugované žlučové kyseliny 20 ng/ml.

Rossi et al. [56] vyvinuli metodu stanovení žlučových kyselin pomocí HPLC s použitím kolony plněné C<sub>18</sub> a detekcí pomocí ultrafialového spektrometru nastaveného na vlnovou délku 200 nm. Vlnová délka 200 nm byla nejvhodnější pro analýzu všech žlučových kyselin i jejich konjugátů, jelikož při této vlnové délce všechny tyto látky absorbují. Mobilní fází byl methanol : 0,01 mol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v poměru 75:25. Ke každému litru této směsi bylo přidáno 4,2 ml 5 mol/l NaOH. pH bylo poté upraveno na přibližně 5,35 pomocí 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Průtok byl nastaven na 0,7 ml/min. Nejnižší detekované množství bylo 5 nmol / 20 µl dávkovaného objemu. Kalibrační závislosti byly lineární v rozmezí 0,01 až 0,5 µmol a korelační koeficienty lineárních regresí se pohybovaly od 0,97 po 0,99.

Kakiyama et al. [57] popsali metodu analýzy žlučových kyselin ve stolici za použití HPLC separace s UV detekcí. Lyofilizované vzorky stolice byly rozemlety na prach, rozpuštěny ve vodě a následně za pomoci octanového pufru (100 mmol/l, pH 5,6) obsahujícího 15 jednotek cholylglycin hydrolázy a 150 jednotek sulfatázy dekonjugovány, a to tak, že tyto vzorky byly inkubovány po dobu 16 hodin při 37 °C. Reakce byla nakonec zastavena přidávkem 2-propanolu a zahřátím na 90 °C po dobu 10 minut. Toto výrazně vylepšilo účinnost SPE extrakce. Poté byly žlučové kyseliny derivatizovány na jejich 24-fenacylestery pomocí triethylaminu a fenacylbromidu a znovu extrahovány pomocí SPE extrakce. Důvodem derivatizace bylo zavedení chromoforu (fenylacylová skupina) do analyzované molekuly, což umožnilo UV detekci při vyšších vlnových délkách (254 nm oproti obvyklým 200 nm používaným k detekci nederivatizovaných nekonjugovaných žlučových kyselin). Tím se zvýšila citlivost i selektivita detekce. Navíc se fenacylestery dobře separovaly na C<sub>18</sub> koloně jednoduchou mobilní fází (methanol : voda). Nástřik byl vždy 20 µl. Pro analýzu byla použita kolona C<sub>18</sub> (300 mm × 3,9 mm vnitřní průměr × 4 µm velikost částic) s ochrannou předkolonou. Teplota kolony byla po celou dobu analýzy udržována na 32 °C. Jako mobilní fáze byl použit 82% methanol s průtokem udržovaným konstantně na 0,65 ml/min. Jako detektor sloužil duální spektrometrický detektor nastavený na vlnovou délku 254 nm. Meze detekce byly

1,2 – 1,5 pmol / 20  $\mu$ l, meze stanovitelnosti byly 2,4 – 7,3 pmol / 20  $\mu$ l. Návratnost se pohybovala mezi 85–102 %. Tato metoda byla následně validována pomocí GC-MS a HPLC-MS a použita pro stanovení žlučových kyselin u zdravých lidí a lidí s mírnou a pokročilou cirhózou jater.

### **1.2.2 Stanovení žlučových kyselin pomocí elektroanalytických metod**

Žlučové kyseliny neobsahují ve své struktuře snadno oxidovatelnou nebo redukovatelnou skupinu, a proto použití elektroanalytických metod pro jejich analýzu není obvyklé. Možnosti využití těchto metod začaly být více zkoumány až v posledních letech, a tak není mnoho odborných publikací, jež se tímto tématem zabývají. V roce 2012 vydali Pecková a Nesměrák [58] přehledový článek popisující elektrochemii žlučových kyselin, cholesterolu a souvisejících sloučenin. Tento článek se zabývá pouze redukcí žlučových kyselin, jež však není předmětem této diplomové práce. V dřívějších letech bylo publikováno pouze několik prací zabývajících se oxidací žlučových kyselin pomocí elektrochemických metod.

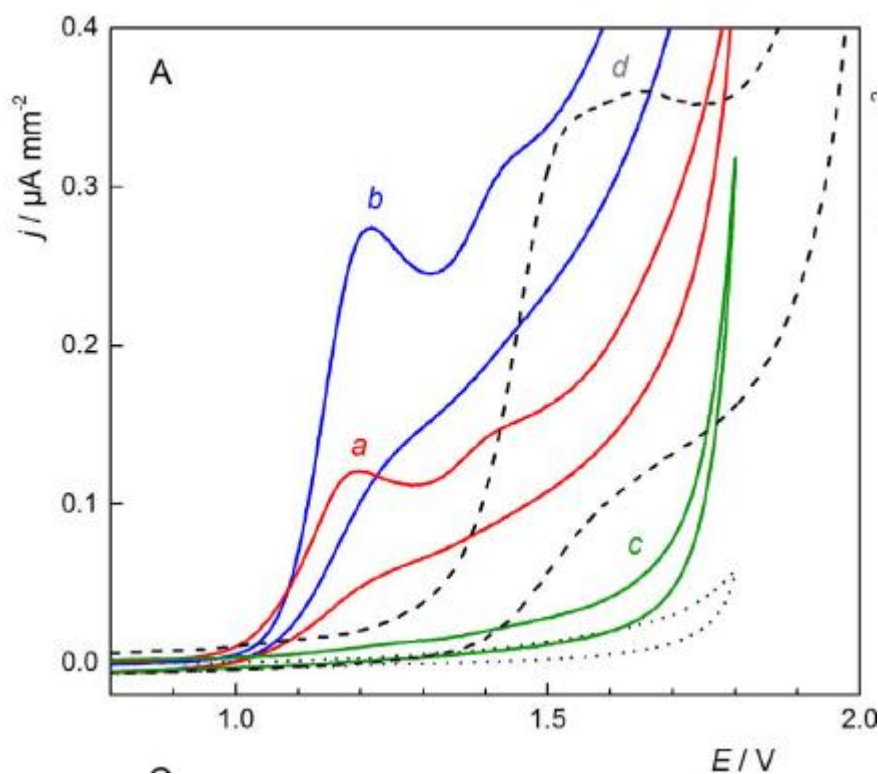
Scalia et al. [59] v roce 1994 vydali článek popisující možnost elektrochemické detekce žlučových kyselin (cholové, chenodeoxycholové, deoxycholové, lithocholové a ursodeoxycholové) po jejich separaci pomocí HPLC. Separace byla provedena na reverzní fázi na  $C_{18}$  koloně (150 mm  $\times$  4,6 mm vnitřní průměr) s mobilní fází o složení methanol : acetonitril : 0,07 mol/l vodný roztok octanu sodného (50:20:25, v/v/v) o aciditě upravené na pH 5 pomocí kyseliny fosforečné. Separace byla prováděna za ambientní teploty a průtok byl nastaven na 0,9 ml/min. Detekce byla zajištěna nejen pomocí elektrochemického detektoru, ale také pomocí UV detekce. UV detektor byl předřazen před elektrochemickou detekci a byl nastaven na vlnovou délku 210 nm. Elektrochemický detektor se skládal z dvou coulometrických cel v sérii za sebou. Potenciál pracovní elektrody v první, kontrolní cele byl nastaven na +0,6 V, ve druhé, analytické cele na +1,4 V. Mez detekce žlučových kyselin se pohybovala v rozmezí 0,20-0,25  $\mu$ g v dávkovaném objemu. Kalibrační závislosti ploch píků proti množství analytu v nástřiku byly lineární až po 20  $\mu$ g s korelačními koeficienty vyššími než 0,991. Návratnost se pohybovala mezi 98–103 %.

Medici et al. [60] popisují metodu elektrochemické oxidace cholové kyseliny a její využití pro syntézu oxo-derivátů této kyseliny. Cholová kyselina zde byla oxidována nepřímo pomocí mediátoru. Jako mediátor byl použit NaCl, elektrolytem byl NaClO<sub>4</sub>. Jako pracovní elektrody byly testovány elektrody ze tří materiálů, a to mřížka z Ti/PbO<sub>2</sub>, platinová folie a grafitová desková elektroda. Bylo zjištěno, že materiál anody ovlivňuje složení produktů v reakční směsi. Rychlost oxidace hydroxylových skupin na uhlících v polohách 3,7 a 12 za vzniku příslušných oxo-skupin klesá v pořadí C<sub>7</sub>>C<sub>12</sub>>C<sub>3</sub>. Elektrochemická oxidace probíhá jako povrchová reakce. Nepřítomnost chlorovaných derivátů cholové kyseliny vede k závěru, že objemová reakce chlornanu, respektive kyseliny chlorné, vznikající při oxidaci přítomných chloridových iontů, je zcela druhotná. Přímá oxidace cholové kyseliny v nepřítomnosti NaCl zjevně neprobíhá. Nelze vyloučit, že vysoce reaktivní hydroxylové radikály, které vznikají na elektrodách z PbO<sub>2</sub> při vysokých proudových hustotách, by mohly vést k neselektivní oxidaci případně až k mineralizaci žlučové kyseliny.

Klouda et al. [1] vyvinuli metodu analýzy žlučových kyselin (cholové, chenodeoxycholové) pomocí voltametrie na diskových elektrodách. Žlučové kyseliny byly dehydratovány pomocí 0,1 mol/l kyseliny chloristé. Tato dehydratace přináší do steroidního skeletu dvojnou vazbu, což může zvyšovat elektrochemickou aktivitu dané látky. V případě cholesterolu byla tato dvojná vazba identifikována jako místo elektrochemického ataku. Tento elektrochemický přístup může potenciálně pomoci při diagnostice poruch syntézy žlučových kyselin. Analýza probíhala s použitím potenciostatu v tříelektrodovém zapojení. Jako měrné elektrody byly použity borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE), elektroda ze skelného uhlíku (GCE) a platinová disková elektroda. Elektrody byly před každou analýzou leštěny pomocí suspenze aluminy v deionizované vodě. Referenční elektrodou byla argentschloridová elektroda a funkci pomocné elektrody zastávala platinová elektroda. Všechny experimenty byly provedeny za laboratorní teploty 21 °C. Doba kontaktu žlučové kyseliny a HClO<sub>4</sub> a jejich koncentrace v případě voltametrické detekce je uvedena u popisku voltamogramů (obr. 10 – 12).

Nejprve byly zaznamenány cyklické voltamogramy jednotlivých látek na BDD elektrodě, čímž se potvrdilo, že celý proces je velice závislý na struktuře látky.

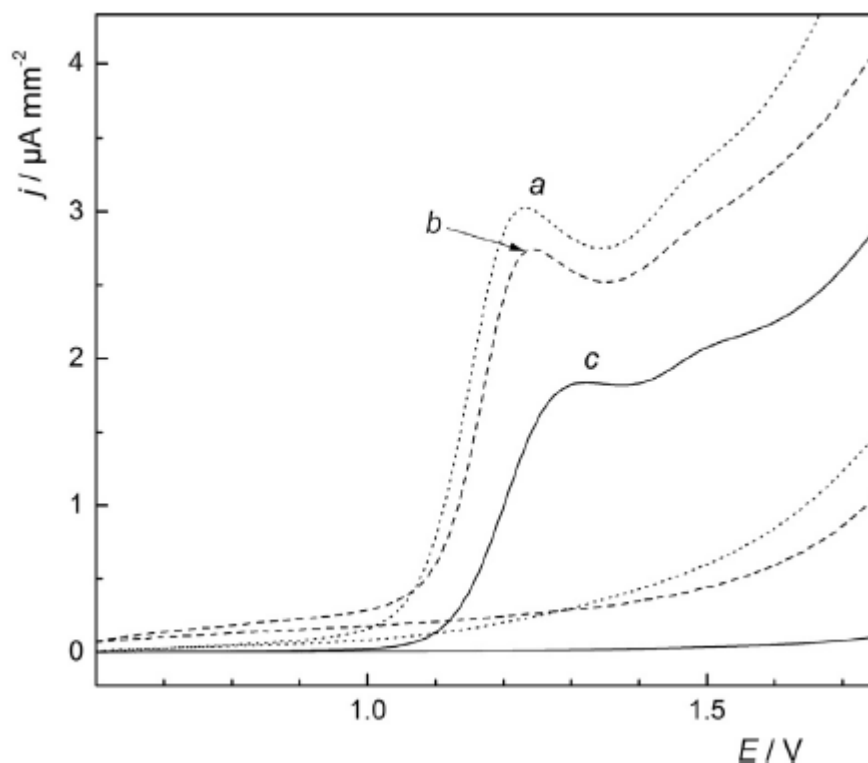
Jen primární žlučové kyseliny s axiální 7 $\alpha$ -hydroxylovou skupinou (CA, CDCA) poskytovaly ireverzibilní anodické signály při potenciálech okolo +1,2 V (obr. 10). Takto nízké oxidační potenciály nebyly dosud zaznamenány. To platí nejen pro žlučové kyseliny, ale také pro ostatní steroidní látky postrádající nebo mající pouze izolované dvojnásobné vazby, cholesterol nevyjímaje. U sekundárních žlučových kyselin nesoucích 7 $\beta$ -hydroxylovou skupinu v případě UDCA anebo úplně postrádající hydroxylovou skupinu v poloze C<sub>7</sub> u deoxycholové a lithocholové kyseliny anodické signály při těchto potenciálech chybí (obr. 10, křivka c).



Obrázek 10 Cyklické voltamogramy CA (a), CDCA (b), UDCA (c) ( $c = 9 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a cholesterolu (d) ( $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) v acetonitrilovém roztoku obsahujícím 0,1M HClO<sub>4</sub> a 0,43 % H<sub>2</sub>O na BDD elektrodě [1].

Oxidační proces může být proveden na více elektrodových materiálech, jako jsou BDDE, GCE a platina s porovnatelnými pozitivními potenciály. Nejlepší poměr signál / šum poskytuje BDDE, což předurčuje tento materiál pro analytické použití (obr. 11). Předběžné voltametrické experimenty na tomto elektrodovém

materiálu naznačují lineární koncentrační závislost s detekčními limity v řádu mikromolárních koncentrací pro obě měřitelné žlučové kyseliny.

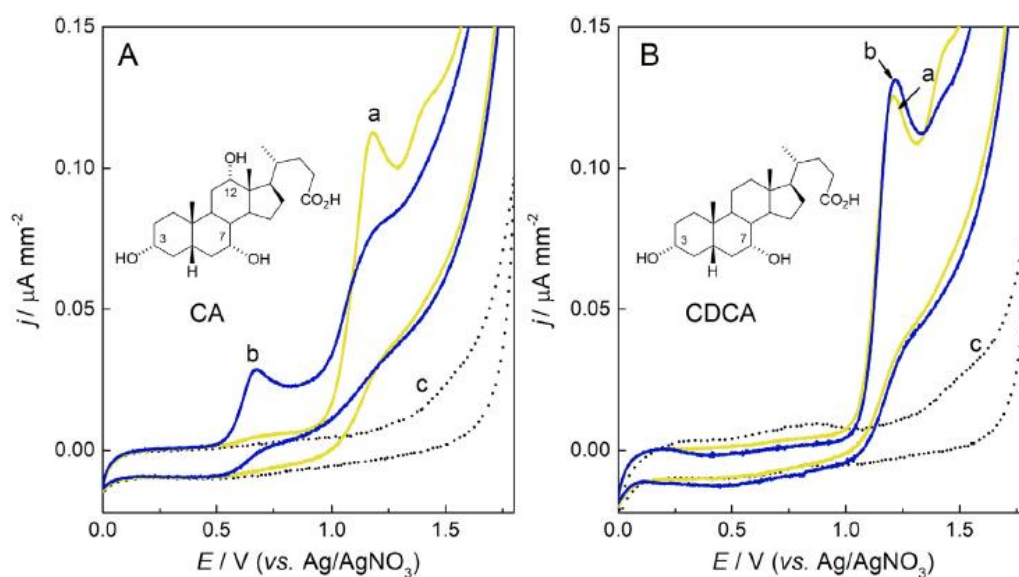


Obrázek 11 Lineární voltamogramy CDCA ( $c = 9 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) na Pt (a), GCE (b) a BDDE (c) elektrodách. Podpůrné elektrolyty: acetonitril obsahující 0,1M  $\text{HClO}_4$  a 0,43 %  $\text{H}_2\text{O}$ . Voltamogramy byly zaznamenány 70 minut po přípravě roztoků, rychlost skenu byla  $50 \text{ mV s}^{-1}$  [1].

Klouda et al. [61] popisují v článku z roku 2020 voltametričnou analýzu žlučových kyselin na borem dopované diamantové elektrodě v séru. Voltametričké podmínky jsou téměř identické jako v předchozím článku. Byla použita BDD pracovní elektroda, jako referenční byla použita argentchloridová elektroda a jako pomocná sloužila platinová elektroda. Vzorky byly opět rozpuštěny v acetonitrilu, a to proto, že je obtížně oxidovatelný, a dehydratovány pomocí 0,1 mol/l kyseliny chloristé, avšak zde již proběhlo experimentování s délkou kontaktu vzorku s  $\text{HClO}_4$  a také s teplotami, při nichž dehydratace probíhala. To bylo z toho důvodu, že dehydratace 0,1 mol/l  $\text{HClO}_4$  v acetonitrilu je poměrně pomalá reakce a trvá přibližně hodinu, než se voltametričkový signál při potenciálu +1,2 V stabilizuje. Bylo



zjištěno, že při zahřívání roztoku na 50 °C po dobu 5 minut vzniká relativně stabilní ireverzibilní voltametrický signál s porovnatelnou intenzitou obdrženu při potenciálu +1,2 V. Při stejné době zahřívání, avšak nižší teplotě, již nebylo dosaženo takového signálu. Bylo také zjištěno, že delší zahřívání není prospěšné, jelikož intenzita signálu CA při zahřívání na 50 °C po dobu 30 minut poklesla asi o 55 %. Dále se také při delším zahřívání začal u CA objevovat pík při potenciálu +0,67 V (obr. 12A). To je pravděpodobně zapříčiněno vznikem dalšího dehydratačního produktu.



Obrázek 12 Cyklické voltamogramy CA (A) a CDCA (B) ( $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) s 0,1M  $\text{HClO}_4$  v acetonitrilu. Žlutá linie (a) odpovídá zahřívání 5 min / 50 °C; modrá linie (b) odpovídá zahřívání 30 min / 50 °C[61].

Pro dehydrataci žlučových kyselin byly také zkoušeny jiné anorganické kyseliny jako  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , avšak ty se ukázaly být neefektivní. Meze detekce byly 0,5  $\mu\text{mol/l}$  pro CA a 1  $\mu\text{mol/l}$  pro CDCA. Metoda byla použita pro detekci CA a CDCA ve vzorcích umělého a lidského séra po SPE extrakci na  $\text{C}_{18}$  kolonce. Voltametrickou metodou byly pro vzorky lidského séra dosaženy výtěžnosti 80-90 % ve shodě s referenční metodou HPLC s fluorescenční detekcí.

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použité chemikálie

Studovanými látkami byly dvě žlučové kyseliny, a to cholová kyselina (o garantované minimální čistotě 98 %) a chenodeoxycholová kyselina (o garantované čistotě minimálně 97 %). Dále byly použity konjugáty těchto žlučových kyselin, a to s taurinem a glycinem, tedy přesně taurocholát sodný hydrát (o garantované čistotě minimálně 97 %), taurochenodeoxycholát sodný (o garantované čistotě minimálně 95 %), hydrát glykocholové kyseliny (o garantované čistotě minimálně 97 %) a glykochenodeoxycholát sodný (o garantované čistotě minimálně 97 %). Všechny tyto látky byly dodány firmou Sigma-Aldrich, Německo. Poslední studovanou látkou byl dehydratační produkt chenodeoxycholové kyseliny, označený jako VB-A-325. VB-A-325 byl syntetizován na Katedře organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Čistota této látky nebyla známa.

Další použité chemikálie byly hydroxid sodný p.a. (Lach:ner, Česká republika), chloristan sodný monohydrát p.a. (Fluka Chemie, Švýcarsko), kyselina chloristá 70% p.a. (Lachema, Česká republika), acetonitril p.a. (Penta, Česká republika), acetonitril HPLC grade (VWR international, Francie), acetonitril HPLC grade (Fisher Scientific, Spojené království), methanol HPLC grade (Honeywell, Eur. Community).

### 2.2 Použité přístroje

Elektrochemická měření byla provedena na přístroji potenciostat/galvanostat Autolab PGSTAT128N (Metrohm Autolab, Nizozemsko) ovládaném pomocí softwaru Nova 1.11 (Metrohm Autolab, Nizozemsko).

Pro HPLC analýzu bylo použito HPLC systému UltiMate 3000 (Thermo Scientific Dionex, Massachusetts, USA) s UV detektorem. Jako ovládací prvek těchto přístrojů byl užíván software Chromeleon 7. Separační kolonou byla Hypersil Gold C<sub>18</sub> (100 mm × 4,6 mm vnitřní průměr × 5 μm velikost částic). Elektrochemickou detekci zajišťovala elektrochemická pracovní stanice Nanoampere (L-Chem, Česká republika) s amperometrickým softwarem, jenž byl vytvořen v prostředí LabVIEW (National Instruments, Texas, USA).

Pro přípravu vzorků byla využita ultrazvuková lázeň Polsonic Ultrasonic cleaner Sonic-6 a magnetická míchačka s ohřevem Heidolph MR Hei-Standard s elektrickým ovladačem teploty Heidolph EKT Hei-Con.

## **2.3 Příprava vzorků**

### **2.3.1 Příprava zásobních roztoků standardů**

Zásobní roztoky standardů byly připraveny z krystalických látek získaných od firmy Sigma-Aldrich kromě VB-A-325, které bylo dodáno z Karlovy Univerzity. Roztoky byly vždy připravovány rozpuštěním známé navážky látky v acetonitrilu HPLC kvality. Každá ze zkoumaných látek má jinou rozpustnost, a proto byly vždy zásobní roztoky připravovány s ohledem na tento fakt. Zásobní roztok CDCA byl připravován v koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  mol/l. Zásobní roztok CA byl připravován v koncentraci  $2,5 \times 10^{-4}$  mol/l. Zásobní roztoky konjugátů s taurinem a glycinem byly připraveny v koncentraci  $1 \times 10^{-4}$  mol/l. Zásobní roztok VB-A-325 byl připravován v koncentraci  $1 \times 10^{-3}$  mol/l. U všech látek ale obzvláště u konjugátů byl problém s rozpouštěním, a proto bylo třeba provádět rozpouštění v ultrazvukové lázni za zvýšené teploty. Takto rozpouštěné zásobní roztoky nevykazovaly žádnou nestabilitu po dobu měření, pokud byly uloženy v lednici.

### **2.3.2 Příprava roztoků pro voltametrii**

Pro voltametriká měření bylo vždy připraveno 5 ml roztoku do odměrné baňky. Roztoky byly vždy připravovány ze zásobních roztoků dané žlučové kyseliny, zásobního roztoku 1 mol/l kyseliny chloristé v acetonitrilu nebo roztoku 1 mol/l chloristanu sodného v acetonitrilu. V případě cholové a chenodeoxycholové kyseliny byly roztoky připraveny tak, aby bylo dosaženo požadované koncentrace žlučové kyseliny a výsledná koncentrace kyseliny chloristé byla 0,1 mol/l. Po rysku byla baňka doplněna acetonitrem. Dále byly tyto roztoky zahřívány po dobu pěti minut ve vodní lázni při teplotě 50 °C. Tento krok je kritický pro to, aby došlo k dehydrataci pomocí kyseliny chloristé a vznikla elektrochemicky aktivní látka. Tyto podmínky byly převzaty z práce Klouda et al. [61]. V případě VB-A-325 byl roztok připraven obdobně, jen místo kyseliny chloristé byl jako elektrolyt použit chloristan sodný a jeho výsledná koncentrace byla 0,1 mol/l. U tohoto vzorku již nebylo třeba provádět dehydrataci, jelikož se jedná o dehydratační produkt.

### 2.3.3 Příprava roztoků pro HPLC analýzu

Pro HPLC analýzu byla zvolena mobilní fáze tvořená ze 70 % methanolem (kvality pro HPLC) a z 30 % pufrům 50 mmol/l  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  v deionizované vodě o pH 2,5 (byl připraven titrací 0,05M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  roztokem 44% NaOH za použití pH metru s kombinovanou skleněnou pH elektrodou) s přidavkem 50 mmol/l  $\text{NaClO}_4$ .

Vzorky pro HPLC analýzu byly připravovány do 1 ml šroubovacích vialek, a to z důvodu, že nebylo třeba velkých objemů a také v rámci úspory materiálu. Vzorky VB-A-325 byly připravovány tak, aby bylo vždy dosaženo požadované koncentrace VB-A-325 a doplněny acetonitrilem do objemu 0,5 ml. Každý vzorek se pro lepší separaci naředil 1:1 mobilní fází (viz výše), a to do celkového objemu 1 ml.

Vzorky žlučových kyselin a jejich konjugátů byly však připravovány jinak, a to z důvodu potřeby kroku dehydratace. Vzorky byly také připravovány do 1 ml šroubovacích vialek. Zde bylo však vždy třeba připravit dvojnásobnou koncentraci žlučové kyseliny či konjugátu, a to proto, že po provedení dehydratace se vzorek naředil 1:1 s mobilní fází. Bylo tedy vždy přidáno potřebné množství základního roztoku žlučové kyseliny či konjugátu, kyseliny chloristé, a to tak aby bylo dosaženo její výsledné koncentrace 0,1 mol/l, což bylo 100  $\mu\text{l}$  1 mol/l  $\text{HClO}_4$ . Roztok byl následně doplněn acetonitrilem do objemu 940  $\mu\text{l}$ . Zde bylo ponecháno místo pro hydroxid sodný, který se dodával po provedení dehydratace pro úpravu výsledné acidity přibližně na pH 2. Pomocí experimentálních měření bylo toto množství zjištěno jako 60  $\mu\text{l}$  1 mol/l hydroxidu sodného. Tato částečná neutralizace byla prováděna z důvodu ochrany oktadecylsilikagelové stacionární fáze, která by mohla být poškozována příliš kyselým pH. Dehydratace probíhala ve vodní lázni při teplotě 50 °C, a to po dobu 5 minut u CA a CDCA a po dobu 15 minut u konjugátů. V případě směšného vzorku byla zvolena doba 15 minut. Po této dehydrataci bylo přidáno 60  $\mu\text{l}$  již dříve zmíněného roztoku 1M NaOH. Následným krokem bylo naředění vzorku 1:1 mobilní fází. Takový vzorek byl již připraven k analýze. Všechny takto připravené vzorky není možné skladovat a vzorek musí být připravován vždy těsně před analýzou. To je z důvodu, že i po částečné neutralizaci dehydratace stále probíhá, může tedy docházet k dalším chemickým procesům a tím se i snižovat množství látky, kterou jsme schopni detekovat.

## 2.4 Voltametrie

Všechny voltametrické experimenty byly prováděny s použitím tříelektrodeového zapojení. Pracovními elektrodami byly dvě elektrody, a to elektroda ze skelného uhlíku (GCE) anebo elektroda z borem dopovaného diamantu (BDDE). Dále funkci referenční elektrody zastávala elektroda Ag | 0,01 mol/l AgNO<sub>3</sub>, 1 mol/l NaClO<sub>4</sub> v acetonitrilu. Platinový drátek sloužil jako elektroda pomocná. Měření byla prováděna v roztocích popsanych v kapitole 2.3.2.

### 2.4.1 Diferenční pulzní voltametrie

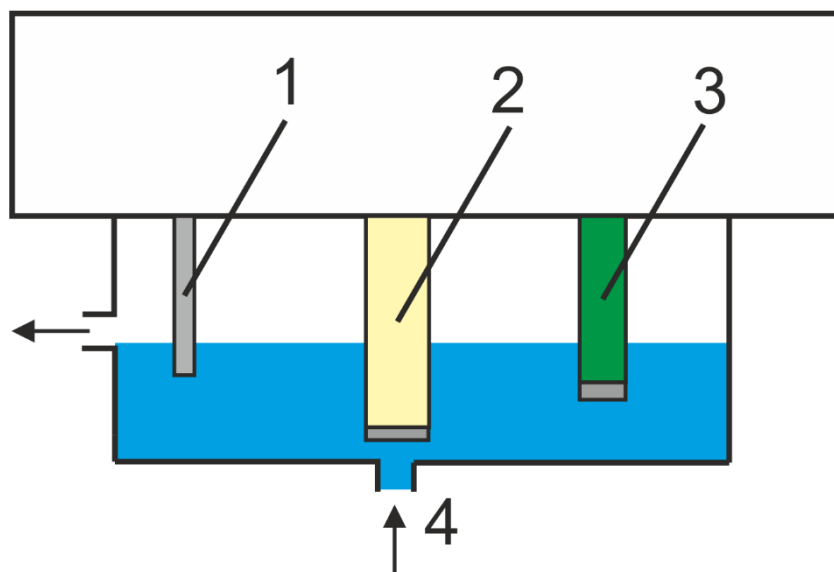
Měření diferenčních pulzních voltamogramů studovaných látek, a to CA, CDCA a VB-A-325, bylo prováděno za následujících podmínek: ekvilibrační čas 5 s, rozsah potenciálů +0,2 až +1,4 V, rychlost skenu 50 mV/s, šířka pulzu 5 ms, modulační amplituda 50 mV, potenciál kroku 5 mV, interval mezi pulzy 0,1 s.

Měření byla prováděna u všech tří látek na obou elektrodách, a tedy jak na GCE, tak na BDDE. Elektroda byla vždy před použitím pro analýzu vyleštěna pomocí aluminy (0,05 μm) a alumina byla z elektrody spláchnuta destilovanou vodou. Před samotnou analýzou byla však elektroda ještě opláchnuta acetonitrilem p.a., a to z důvodu, aby bylo udrženo prostředí pro voltametrická měření co nejvíce bezvodé.

## 2.5 HPLC analýza

Jako mobilní fáze pro separaci žlučových kyselin a jejich konjugátů byla použita směs methanolu a vodného roztoku pufru 50 mmol/l H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o pH 2,5 s přidavkem 50 mmol/l NaClO<sub>4</sub> v objemovém poměru 70 : 30 (kap. 2.3.3). Průtoková rychlost byla nastavena na 0,6 ml/min. Dávkování bylo prováděno přeplněním dávkovací smyčky o objemu 50 μl.

Pro detekci separovaných analytů bylo využito dvou detektorů zapojených v sérii. Prvním byl UV detektor nastavený na vlnovou délku 200 nm. Druhým detektorem byl elektrochemický detektor, jenž byl sestaven z průtokové elektrochemické cely s tříelektrodeovým zapojením. Pracovní elektrodou byla BDDE, referenční Ag | 0,01M-AgNO<sub>3</sub>, 1M-NaClO<sub>4</sub> v acetonitrilu a pomocnou elektrodou byl platinový drátek. Tato průtoková cela byla typu wall-jet (obr. 13). Potenciál analýz byl nastaven na +1,2 V a frekvence měření byla 5 Hz.



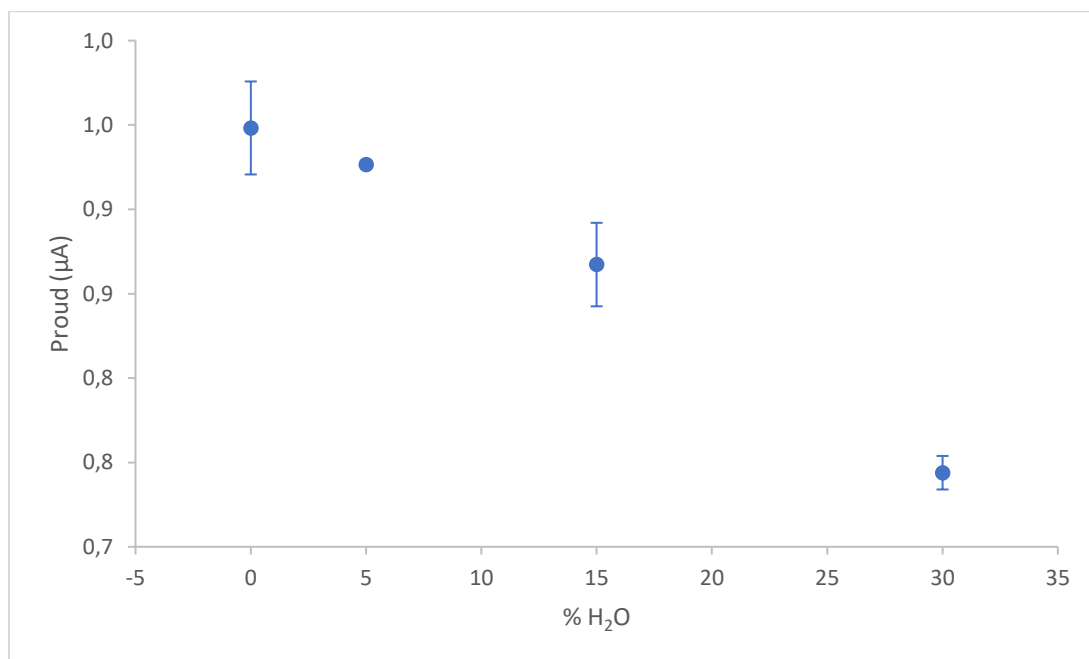
Obrázek 13 Elektrochemická cela detektoru typu wall-jet. 1 – pomocná elektroda, 2 – pracovní elektroda, 3 – referenční elektroda, 4 – přítok z kolony, inspirováno [62]

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

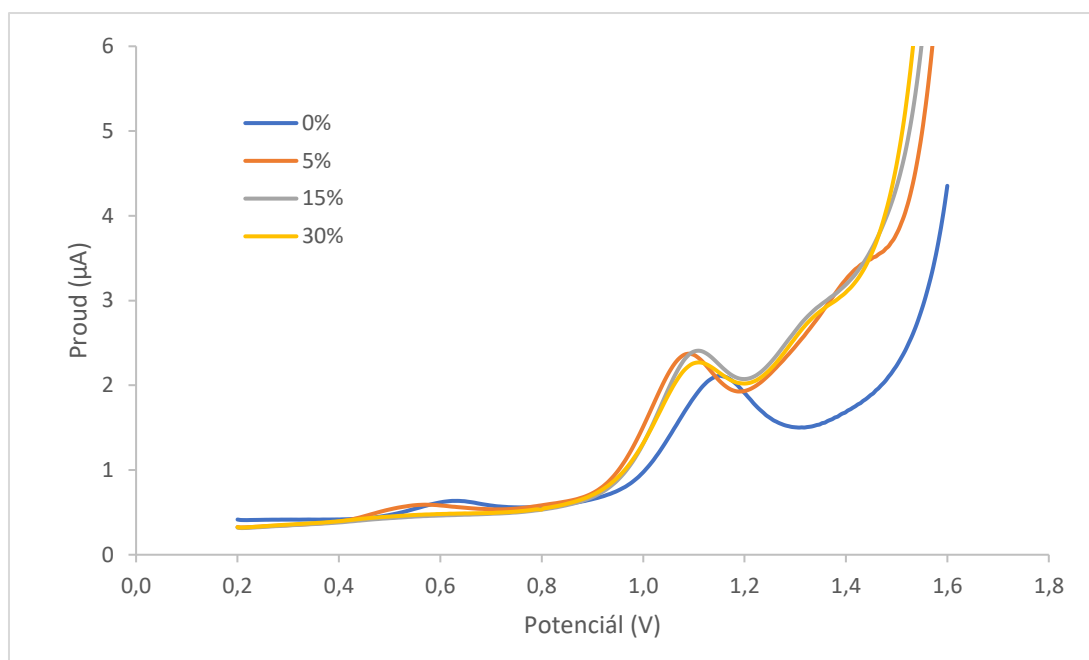
#### 3.1 Vliv obsahu vody na voltametrickou odezvu žlučových kyselin

Jelikož jsou žlučové kyseliny látky dosti nepolární, bylo pro možnost jejich analýzy třeba zjistit, jaký má vliv obsah vody na jejich elektrochemickou oxidaci. Voda musela být přidána až po procesu dehydratace, jelikož pokud byla voda (či methanol) přítomná při procesu dehydratace, tak tento proces neprobíhal. Proto byly všechny dehydratace prováděny pouze v prostředí acetonitrilu. Měřen byl roztok CA o koncentraci  $6 \times 10^{-5}$  mol/l s obsahem přidané vody v rozsahu 0–30 %.

Při tomto měření bylo zjištěno, že nejlepší odezvu má roztok bez přidané vody (obr. 14). S rostoucím obsahem vody docházelo ke snižování proudu, avšak nedocházelo k zásadní změně tvaru píku (obr. 15). Jelikož bylo pro HPLC separaci třeba použít mobilní fázi s obsahem 30 % vody, bylo zde potvrzeno, že takovýto obsah vody stále přináší dosti intenzivní signál detektoru.



Obrázek 14 Vliv obsahu vody na proud DPV píku CA ( $6 \times 10^{-5}$  mol/l) v 0,1 mol/l HClO<sub>4</sub> v ACN. Měřeno v tříelektrodovém zapojení: pracovní elektroda BDDE, referenční elektroda Ag | 0,01 mol/l AgNO<sub>3</sub>, 1 mol/l NaClO<sub>4</sub> v ACN, pomocná platinová elektroda. Parametry DPV: rychlost skenu 50 mV/s, modulační amplituda 50 mV, šířka pulzu 5 ms, interval mezi pulzy 0,1 s. Chybové úsečky reprezentují směrodatné odchylky ze dvou opakovaných měření.



Obrázek 15 Diferenční pulzní voltamogramy CA ( $6 \times 10^{-5}$  mol/l) v 0,1 mol/l HClO<sub>4</sub> v ACN. Měřeno v tříelektrodovém zapojení: pracovní elektroda BDDE, referenční elektroda Ag / 0,01 mol/l AgNO<sub>3</sub>, 1 mol/l NaClO<sub>4</sub> v ACN, pomocná platinová elektroda. Parametry DPV: rychlost skenu 50 mV/s, modulační amplituda 50 mV, šířka pulzu 5 ms, interval mezi pulzy 0,1 s.

### 3.2 Kalibrační závislost pro metodu DPV

Pomocí metody DPV byly měřeny roztoky VB-A-325, CA a CDCA. VB-A-325 bylo měřeno v rozsahu koncentrací  $1 \times 10^{-4}$ – $8 \times 10^{-6}$  mol/l. CA byla měřena v rozsahu koncentrací  $8 \times 10^{-5}$ – $8 \times 10^{-6}$  mol/l, a to z důvodu její špatné rozpustnosti v ACN. CDCA byla měřena v rozsahu koncentrací  $1 \times 10^{-4}$ – $8 \times 10^{-6}$  mol/l. Pro toto měření bylo použito dvou pracovních elektrod, a to GCE a BDDE. Obě elektrody mají dostatečný potenciálový rozsah pro měření všech těchto látek, protože všechny látky se oxidují při potenciálu okolo +1,2 V. V případě měření CDCA na GCE byl měřitelný pouze rozsah  $1 \times 10^{-4}$ – $1 \times 10^{-5}$  mol/l, a to z důvodu, že záznam měření koncentrace  $8 \times 10^{-6}$  mol/l již nebylo možné vyhodnotit.

Z regresních parametrů kalibračních přímk (tabulka 1) byly vypočteny meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) a to pomocí rovnice 1 a rovnice 2. Parametr  $s_b$  je odhad směrodatné odchylky úseku přímky a parametr  $a$  je směrnice přímky lineární závislosti.



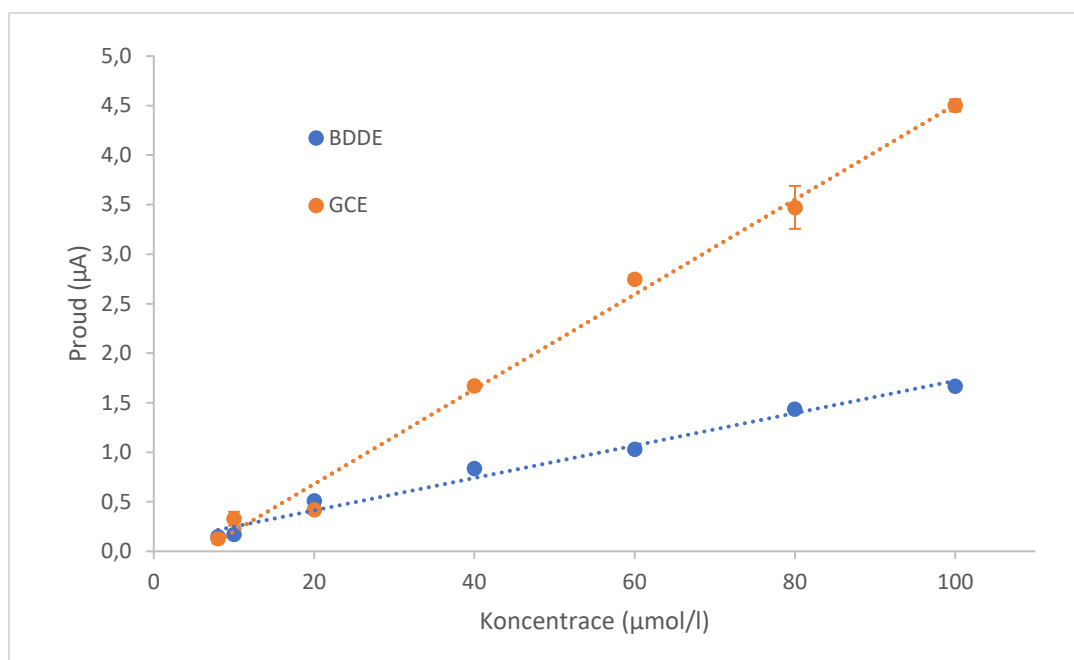
$$LOD = \frac{3 \cdot s_b}{a} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot s_b}{a} \quad (2)$$

Tabulka 1 Regresní parametry, LOD a LOQ pro kalibrační řady VB-A-325, CA a CDCA, změřené metodou DPV.

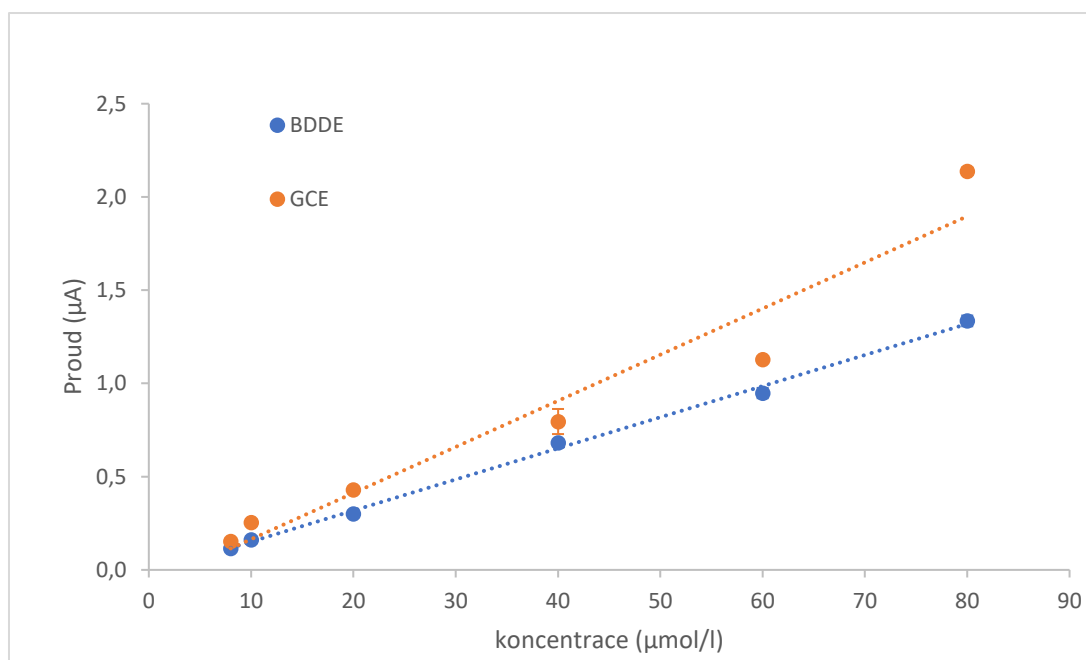
Žlučová kyselina	Koncentrační rozsah (μmol/l)	Elektroda	Směrnice $a$ (μA×l/μmol)	Úsek $b$ (μA)	$R^2$	LOD (μmol/l)	LOQ (μmol/l)
VB-A-325	$1 \times 10^{-4}$ – $8 \times 10^{-6}$	GCE	0,0479±0,0017	0,2792±0,0544	0,9935	17,81	59,37
		BDDE	0,0164±0,0010	0,0849±0,0974	0,9829	9,96	33,19
CA	$8 \times 10^{-5}$ – $8 \times 10^{-6}$	GCE	0,0247±0,0030	-0,083±0,1363	0,9435	24,92	83,08
		BDDE	0,0167±0,0004	-0,0157±0,0190	0,9974	3,48	11,60
CDCA	$1 \times 10^{-4}$ – $8 \times 10^{-6}$	GCE	0,0089±0,0013	-0,0413±0,0802	0,9198	14,66	48,87
		BDDE	0,0044±0,0003	0,0044±0,0186	0,9733	3,40	11,32

Z kalibračních závislostí VB-A-325 (obr. 16) lze vypočítat, že u GCE bylo dosaženo vyšší proudové odezvy v porovnání s BDDE, a to převážně u vyšších koncentrací. Na druhou stranu hodnoty  $LOD$  a  $LOQ$  (tabulka 1) jsou v případě BDDE téměř poloviční oproti GCE.



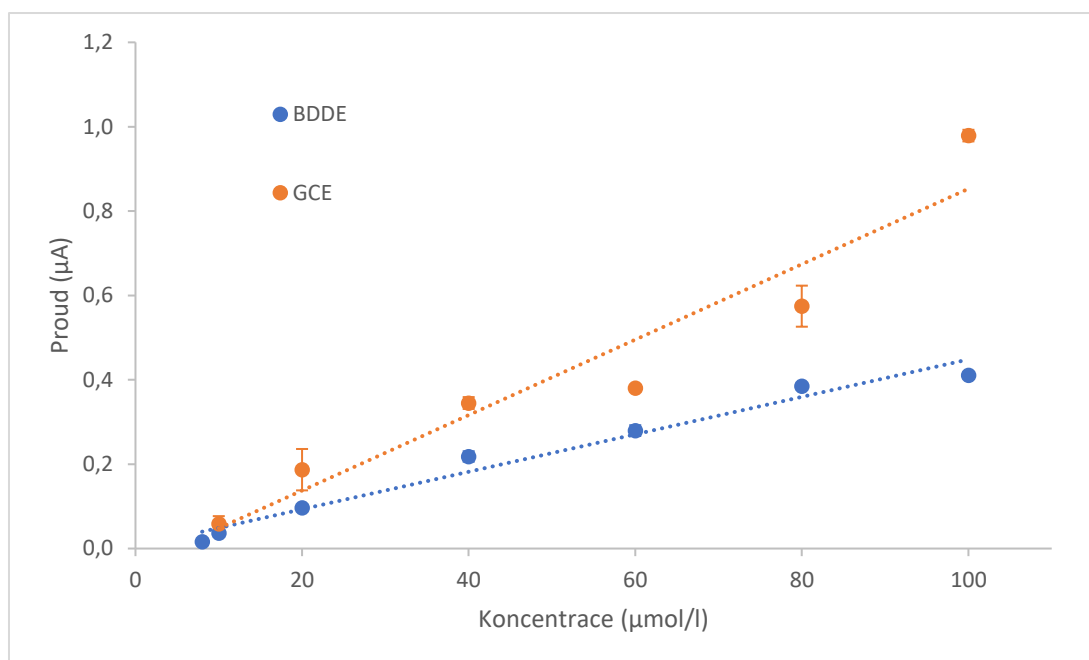
Obrázek 16 Kalibrační závislost VB-A-325 v koncentračním rozsahu  $1 \times 10^{-4}$ – $8 \times 10^{-5}$  mol/l. Měřeno bylo metodou DPV v roztoku 0,1 mol/l NaClO<sub>4</sub> v ACN s použitím tříelektrodového zapojení: pracovní elektroda GCE/BDDE, referenční elektroda Ag | 0,01 mol/l AgNO<sub>3</sub>, 1 mol/l NaClO<sub>4</sub> v ACN, pomocná platinová elektroda. Parametry DPV: rychlost skenu 50 mV/s, modulační amplituda 50 mV, šířka pulzu 5 ms, interval mezi pulzy 0,1 s. Chybové úsečky reprezentují směrodatné odchylky ze dvou opakovaných měření.

V případě kalibrační závislosti CA (obr. 17) lze vidět, že rozdíl proudových odezev na obou pracovních elektrodách již není až tak velký, i když stále GCE dosahovala vyšší proudové odezvy nežli BDDE. V případě GCE je také pravděpodobné, že u vyšších hodnot koncentrace CA již kalibrace není lineární. Markantní rozdíl lze mezi GCE a BDDE nalézt v rozdílu *LOD* a *LOQ* (tabulka 1), kde pro GCE jsou hodnoty oproti BDDE více než sedmkrát vyšší. Lze tedy usoudit, že pro analýzu CA pomocí DPV je jednoznačně lepší použít BDDE.



Obrázek 17 Kalibrační závislost CA v koncentračním rozsahu  $8 \times 10^{-5}$ – $8 \times 10^{-4}$  mol/l. Měřeno bylo metodou DPV v roztoku 0,1 mol/l  $\text{HClO}_4$  v ACN s použitím tříelektrodového zapojení: pracovní elektroda GCE/BDDE, referenční elektroda Ag | 0,01 mol/l  $\text{AgNO}_3$ , 1 mol/l  $\text{NaClO}_4$  v ACN, pomocná platinová elektroda. Parametry DPV: rychlost skenu 50 mV/s, modulační amplituda 50 mV, šířka pulzu 5 ms, interval mezi pulzy 0,1 s. Chybové úsečky reprezentují směrodatné odchylky ze dvou opakovaných měření.

Kalibrační závislost pro CDCA (obr. 18) také ukazuje, že GCE dosahuje vyšších proudových odezev nežli BDDE. Co se týče linearity kalibrace, tak GCE pravděpodobně nedetekuje při vyšších koncentracích lineárně. Rozdíl v *LOD* a *LOQ* (tabulka 1) mezi GCE a BDDE je zde také značně velký, a to tak, že GCE má hodnoty těchto mezí vyšší více než čtyřikrát. Navíc v případě CDCA při nejnižší měřené koncentraci ( $8 \times 10^{-4}$  mol/l) již dávala GCE tak malý proud píku, že jej nebylo možné vyhodnotit. Tím pádem je tedy také pro DPV analýzu CDCA vhodnější využít BDDE.



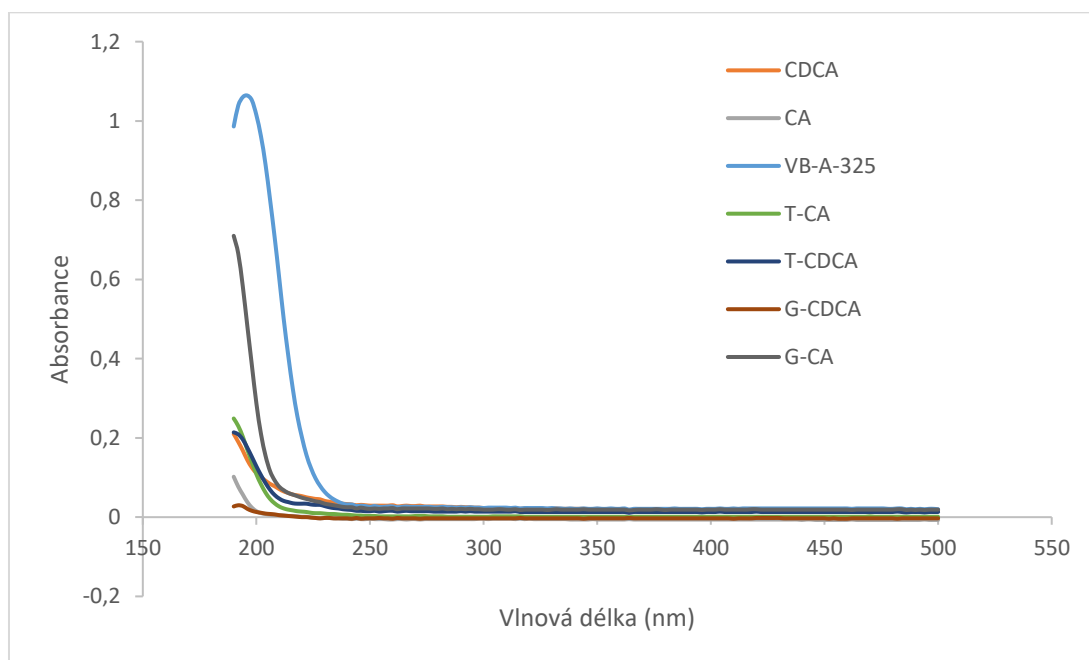
Obrázek 18 Kalibrační závislost CDCA v koncentračním rozsahu  $1 \times 10^{-4}$ – $8 \times 10^{-6}$  mol/l. Měřeno bylo metodou DPV v roztoku 0,1 mol/l  $\text{HClO}_4$  v ACN s použitím tříelektrodového zapojení: pracovní elektroda GCE/BDDE, referenční elektroda Ag | 0,01 mol/l  $\text{AgNO}_3$ , 1 mol/l  $\text{NaClO}_4$  v ACN, pomocná platinová elektroda. Parametry DPV: rychlost skenu 50 mV/s, modulační amplituda 50 mV, šířka pulzu 5 ms, interval mezi pulzy 0,1 s. Chybové úsečky reprezentují směrodatné odchylky ze dvou opakovaných měření.

### 3.3 HPLC separace žlučových kyselin a konjugátů s UV a amperometrickou detekcí

Byla vyvinuta metoda pro analýzu žlučových kyselin a jejich konjugátů pomocí HPLC separace s UV a amperometrickou detekcí. Jako stacionární fáze sloužil oktadecylsilikagel, mobilní fáze byla složena z methanolu a vodného roztoku pufru 50 mmol/l  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  o pH 2,5 (70/30) s přidavkem 50 mmol/l  $\text{NaClO}_4$  s průtokem 0,6 ml/min. Dehydratované žlučové kyseliny (50 °C, 5 min – CA; 50 °C, 5 min – CDCA; bez dehydratace – VB-A-325) i jejich konjugáty (50 °C, 15 min – T-CA; 50 °C, 15 min – T-CDCA; 50 °C, 15 min – G-CA) se separovaly a byly eluovány v redukovaných retenčních časech 4–30 minut. Redukovaný retenční čas cholové kyseliny byl 12,7 min, chenodeoxycholové kyseliny 30 minut, taurocholové kyseliny 4,58 min, taurochenodeoxycholové kyseliny 8,4 min a glykocholové kyseliny 6,39 min. V případě glykochenodeoxycholové kyseliny nebyl detekován signál.

### 3.3.1 UV detekce

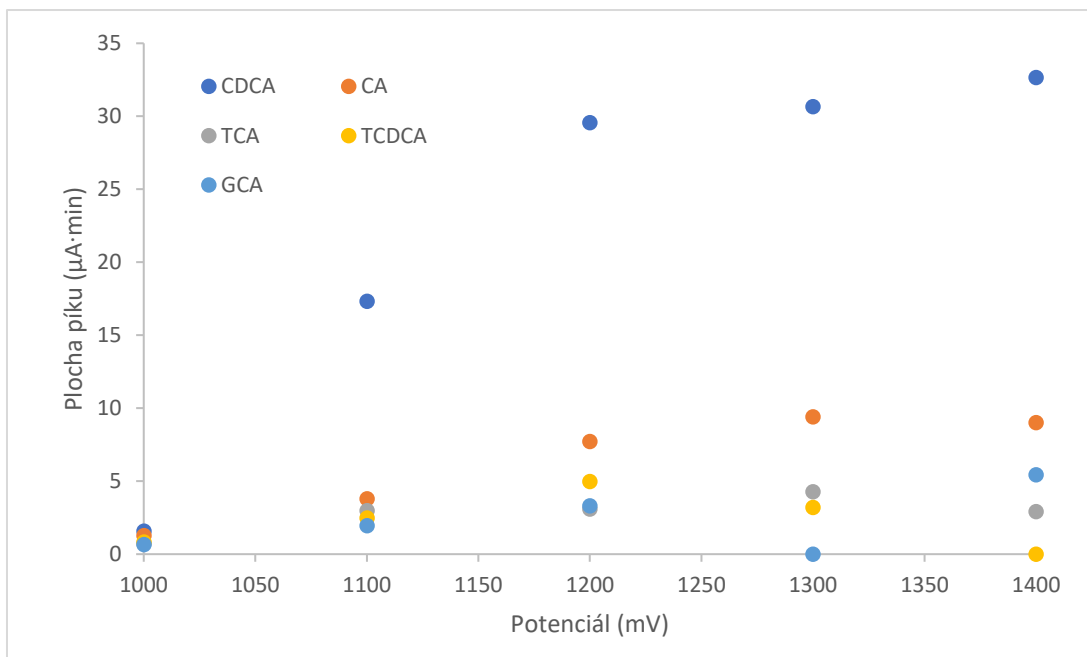
UV spektrometrický detektor byl nastaven na vlnovou délku 200 nm. Tato hodnota byla zvolena na základě měření absorpčních spekter jednotlivých látek (obr. 19). Jak je z těchto absorpčních spekter vidět, všechny látky mají maximum u vlnové délky 200 nm, popřípadě u ještě kratších vlnových délek. Z tohoto důvodu byla zvolena pro detekci po HPLC separaci vlnová délka 200 nm.



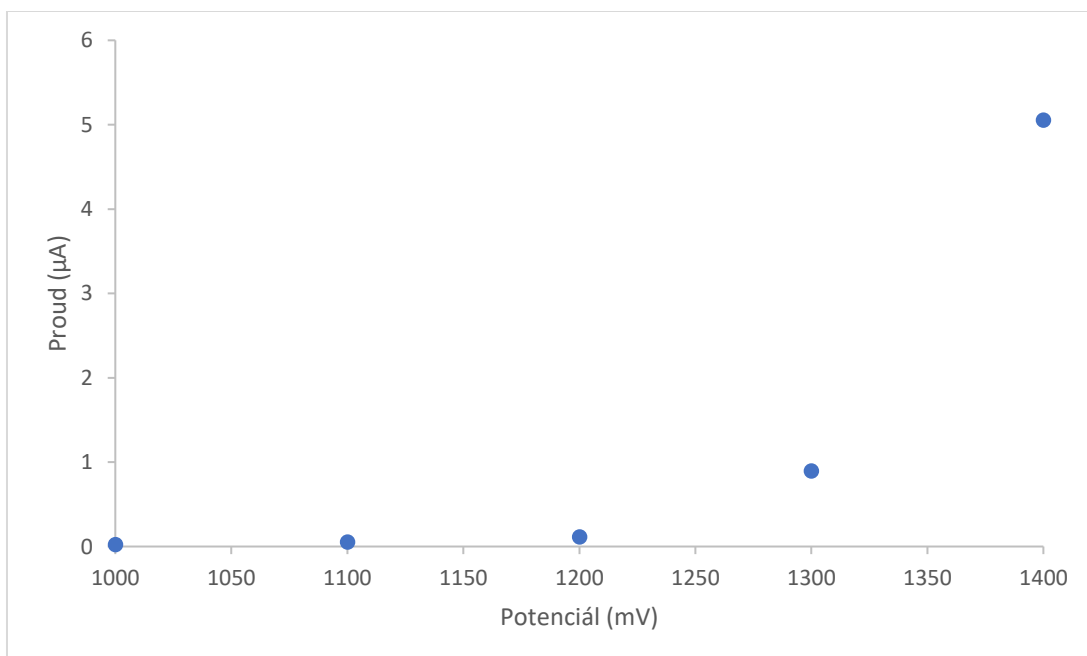
Obrázek 19 Absorpční spektra chenodeoxycholové kyseliny (CDCA), cholové kyseliny (CA), VB-A-325, taurochenodeoxycholové kyseliny (T-CDCA), taurocholové kyseliny (T-CA), glykochenodeoxycholové kyseliny (G-CDCA), glykocholové kyseliny (G-CA).

### 3.3.2 Hydrodynamické voltamogramy analyzovaných látek

Jelikož bylo z předchozích voltametrických měření zřejmé, že se CA a CDCA po dehydrataci v  $\text{HClO}_4$  oxidují v okolí potenciálu +1,2 V, byl proto zvolen rozsah pro měření hydrodynamických voltamogramů +1,0 až +1,4 V (obr. 20). U potenciálu +1,0 V nebyl zaznamenán téměř žádný signál, u potenciálu +1,1 V již byl signál zřetelný. Jako nejvhodnější byl vybrán potenciál +1,2 V, kde je jak velká intenzita signálu, tak také dobrý poměr signál/šum. V případě potenciálů +1,3 V a +1,4 V byly zaznamenány velké hodnoty proudu pozadí (obr. 21) a některé látky (G-CA a T-CDCA) již neposkytovaly proudovou odezvu rozlišitelnou od šumu.



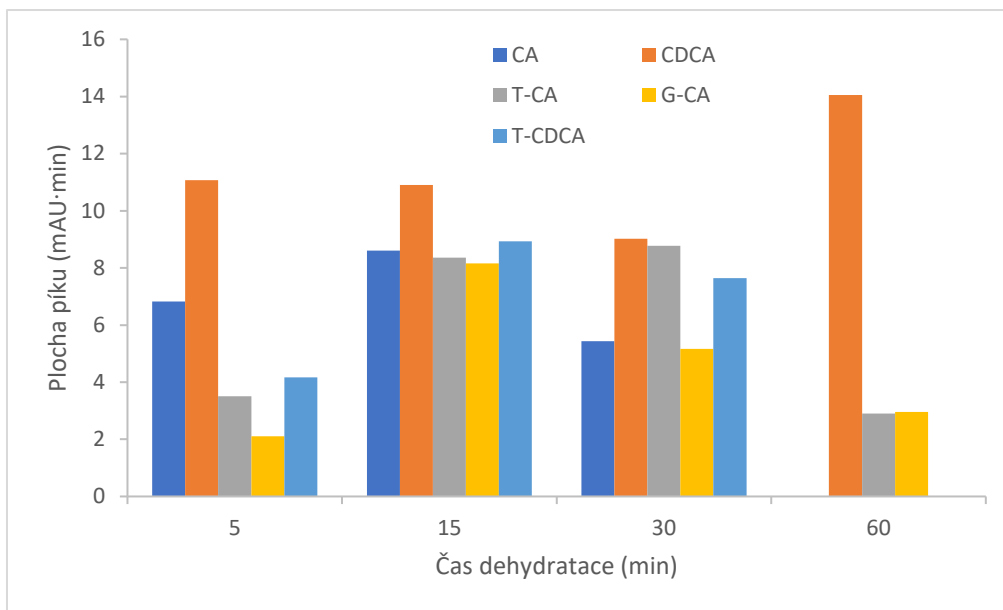
Obrázek 20 Hydrodynamické voltamogramy jednotlivých látek po jejich dehydrataci v  $\text{HClO}_4$  (50 °C, 5 min – CA, 5 min – CDCA, 15 min – T-CA, 15 min – T-CDCA, 15 min – G-CA). Koncentrace roztoků CDCA byla při měření  $1 \times 10^{-4}$  mol/l, CA  $5 \times 10^{-5}$  mol/l, konjugátů  $2,5 \times 10^{-5}$  mol/l. MF: methanol a vodný roztok pufru 50 mmol/l  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  o pH 2,5 (70/30) s přidavkem 50 mmol/l  $\text{NaClO}_4$ . Elektrochemická detekce: Pracovní elektroda BDDE, referenční  $\text{Ag} | 0,01$  mol/l  $\text{AgNO}_3$ , 1 mol/l  $\text{NaClO}_4$  v acetonitrilu, pomocná platinová elektroda.



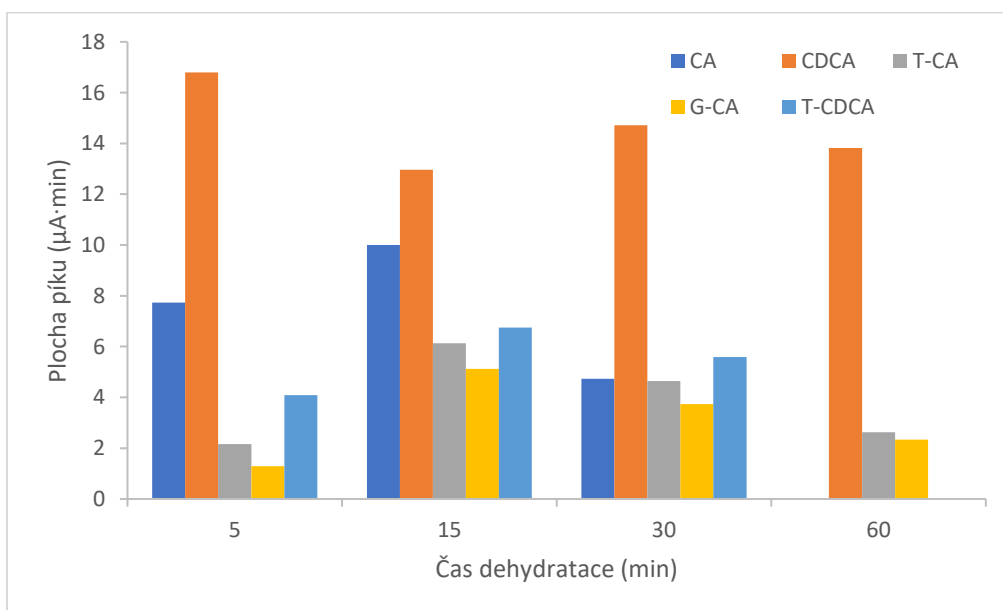
Obrázek 21 Graf závislosti proudu pozadí na potenciálu pro měření hydrodynamických voltamogramů.

### **3.3.3 Vliv doby dehydratace na intenzitu signálu UV a amperometrického detektoru**

Jelikož není přesně znám proces dehydratace žlučových kyselin a jejich konjugátů kyselinou chloristou, byl proto testován vliv doby dehydratace na odezvu. Byly testovány čtyři různé doby dehydratace, a to 5, 15, 30 a 60 minut při 50 °C. Tato teplota byla nalezena jako optimální v práci Klouda et al [61]. Z naměřených dat (obr. 22, 23) lze pozorovat, že všechny kyseliny poskytovaly nejvyšší odezvu na obou detektorech při době dehydratace 15 min, s výjimkou CDCA, jejíž odezva se s dobou dehydratace významněji neměnila. Pro analýzu směsi všech pěti kyselin je proto nejvhodnější doba dehydratace 15 minut.



Obrázek 22 Závislost plochy píku CA, CDCA, T-CA, G-CA a T-CDCA na době dehydratace. Měřená koncentrace roztoků látek byla  $2,5 \times 10^{-5}$  mol/l. MF: methanol a vodný roztok pufru 50 mmol/l  $H_3PO_4/NaH_2PO_4$  o pH 2,5 (70/30) s přidavkem 50 mmol/l  $NaClO_4$ , UV detekce při vlnové délce 200 nm.



Obrázek 23 Závislost plochy píku CA, CDCA, T-CA, G-CA a T-CDCA na době dehydratace. Měřená koncentrace roztoků látek byla  $2,5 \times 10^{-5}$  mol/l. MF: methanol a vodný roztok pufru 50 mmol/l  $H_3PO_4/NaH_2PO_4$  o pH 2,5 (70/30) s přidavkem 50 mmol/l  $NaClO_4$ . Elektrochemická detekce: Pracovní elektroda BDDE, referenční Ag | 0,01 mol/l  $AgNO_3$ , 1 mol/l  $NaClO_4$  v acetonitrilu, pomocná platinová elektroda.



### 3.3.4 Kalibrační závislosti

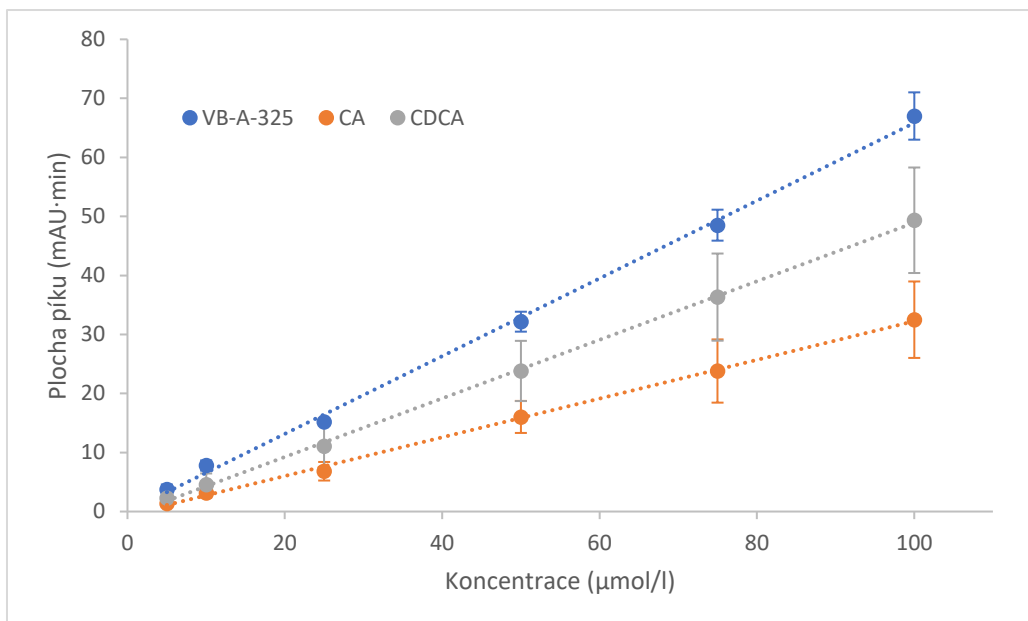
Byly zkonstruovány kalibrační závislosti všech studovaných látek pro oba použité detektory (UV, ECD), kromě G-CDCA, neboť tato látka nebyla ani po dehydrataci detekovatelná. VB-A-325, CA a CDCA byly všechny měřeny v koncentračním rozsahu  $1 \times 10^{-4}$ – $5 \times 10^{-6}$  mol/l (obr. 24, 25). T-CA, G-CA a T-CDCA byly měřeny v koncentračním rozsahu  $5 \times 10^{-5}$ – $5 \times 10^{-6}$  mol/l (obr. 26, 27), jejich vyšší koncentrace nebylo možné měřit z důvodu špatné rozpustnosti těchto kyselin v ACN. Regresní parametry kalibračních přímků všech látek jsou uvedeny v tabulce 2.

*Tabulka 2 Regresní parametry, LOD a LOQ pro kalibrační řady VB-A-325, CA, CDCA, T-CA, G-CA a T-CDCA změřené metodou HPLC s UV a elektrochemickou detekcí (ECD) za použití BDDE jako pracovní elektrody.*

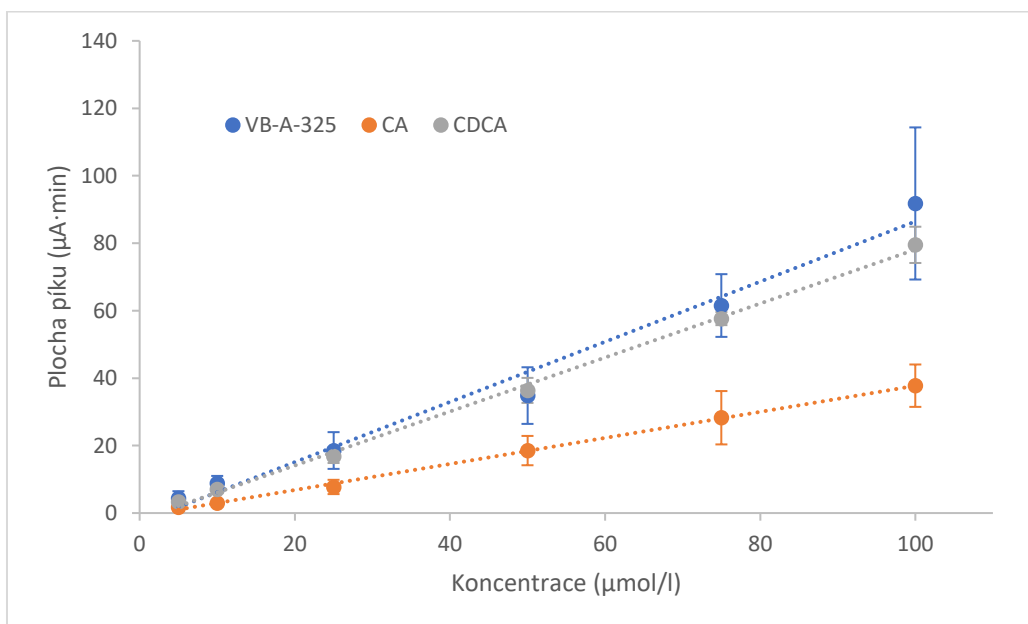
Žlučová kyselina	Koncentrační rozsah (μmol/l)	Detektor	Směrnice $a^*$	Úsek $b^{**}$	$R^2$	LOD (μmol/l)	LOQ (μmol/l)
VB-A-325	$1 \times 10^{-4}$ – $5 \times 10^{-6}$	UV	0,6585±0,0144	-0,0177±0,8086	0,9981	3,68	12,28
		ECD	0,8921±0,0590	-2,7531±3,3085	0,9828	11,12	37,09
CA	$1 \times 10^{-4}$ – $5 \times 10^{-6}$	UV	0,3279±0,0061	-0,5428±0,3418	0,9986	3,13	10,42
		ECD	0,3863±0,0075	-0,8927±0,4193	0,9985	3,26	10,85
CDCA	$1 \times 10^{-4}$ – $5 \times 10^{-6}$	UV	0,4961±0,0060	-0,6809±0,3347	0,9994	2,02	6,75
		ECD	0,8005±0,0178	-1,9194±0,9991	0,9980	3,74	12,48
T-CA	$5 \times 10^{-5}$ – $5 \times 10^{-6}$	UV	0,3236±0,0149	+0,1066±0,3825	0,9937	3,55	11,82
		ECD	0,3023±0,0098	-0,5404±0,2511	0,9969	2,49	8,31
G-CA	$5 \times 10^{-5}$ – $5 \times 10^{-6}$	UV	0,2019±0,0094	-0,0026±0,2424	0,9935	3,60	12,01
		ECD	0,1397±0,0089	+0,4045±0,2286	0,9880	4,91	16,37
T-CDCA	$5 \times 10^{-5}$ – $5 \times 10^{-6}$	UV	0,1771±0,0135	-0,2137±0,3461	0,9830	5,86	19,54
		ECD	0,1455±0,0071	+0,4386±0,1823	0,9929	3,76	12,54

\*UV – mAU×l/μmol; ECD – μA×l/μmol

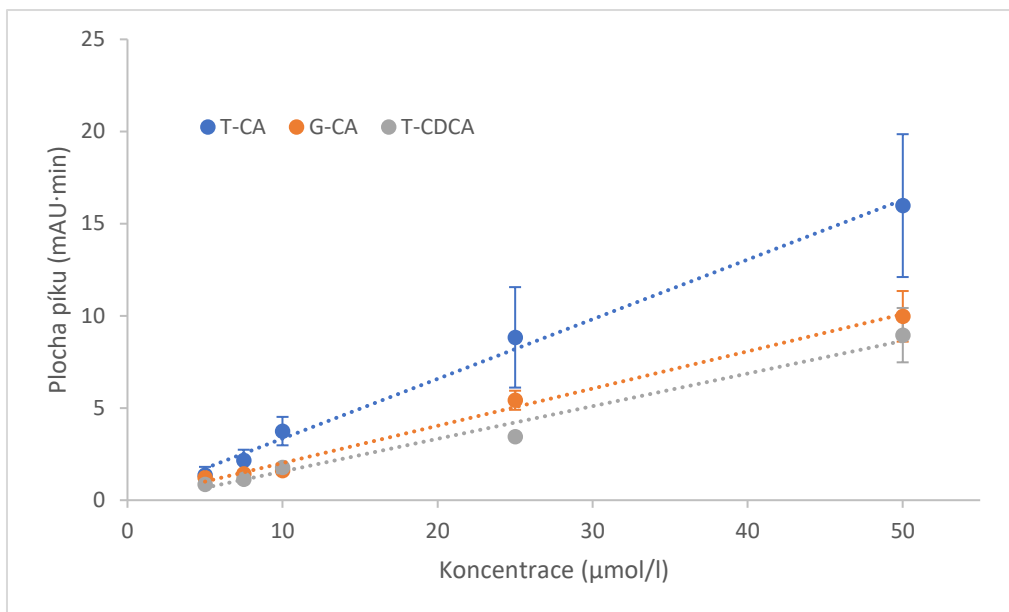
\*\*UV – mAU; ECD – μA



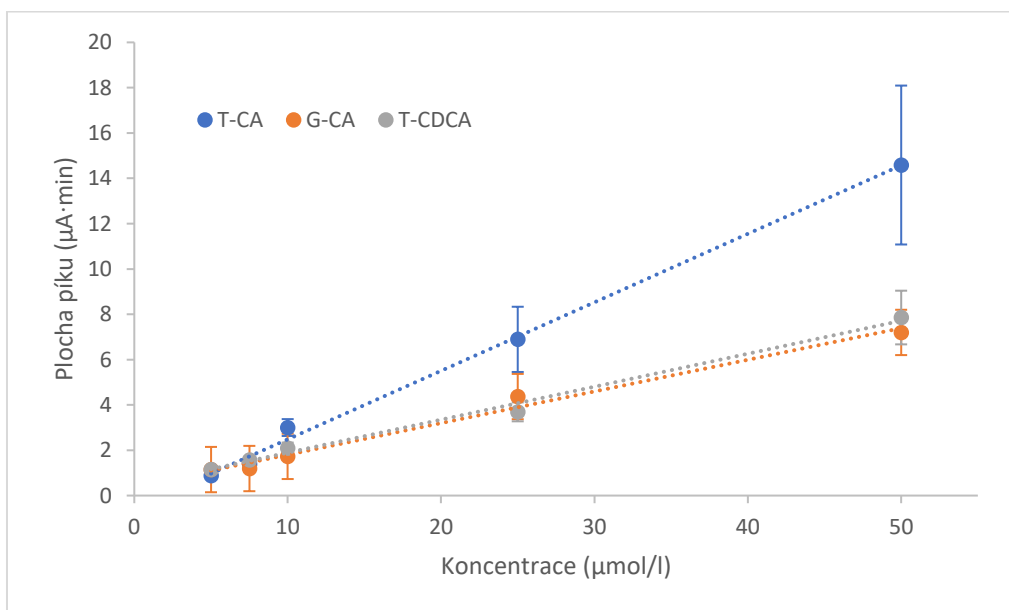
Obrázek 24 Kalibrační závislosti pro VB-A-325, CA (dehydratace 5 min) a CDCA (dehydratace 5 min). MF: methanol a vodný roztok pufru 50 mmol/l  $H_3PO_4/NaH_2PO_4$  o pH 2,5 (70/30) s přidavkem 50 mmol/l  $NaClO_4$ . UV detekce při vlnové délce 200 nm. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchýlkám ze tří opakovaných měření.



Obrázek 25 Kalibrační závislost pro VB-A-325, CA (dehydratace 5 min) a CDCA (dehydratace 5 min). MF: methanol a vodný roztok pufru 50 mmol/l  $H_3PO_4/NaH_2PO_4$  o pH 2,5 (70/30) s přidavkem 50 mmol/l  $NaClO_4$ . Elektrochemická detekce: Pracovní elektroda BDDE, referenční  $Ag | 0,01 \text{ mol/l } AgNO_3, 1 \text{ mol/l } NaClO_4$  v acetonitrilu, pomocná platिनová elektroda. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchýlkám ze tří opakovaných měření.



Obrázek 26 Kalibrační závislosti T-CA (dehydratace 15 min), G-CA (dehydratace 15 min) a T-CDCA (dehydratace 15 min). MF: methanol a vodný roztok pufru 50 mmol/l  $H_3PO_4/NaH_2PO_4$  o pH 2,5 (70/30) s přidavkem 50 mmol/l  $NaClO_4$ . UV detekce při vlnové délce 200 nm. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám ze dvou opakovaných měření.



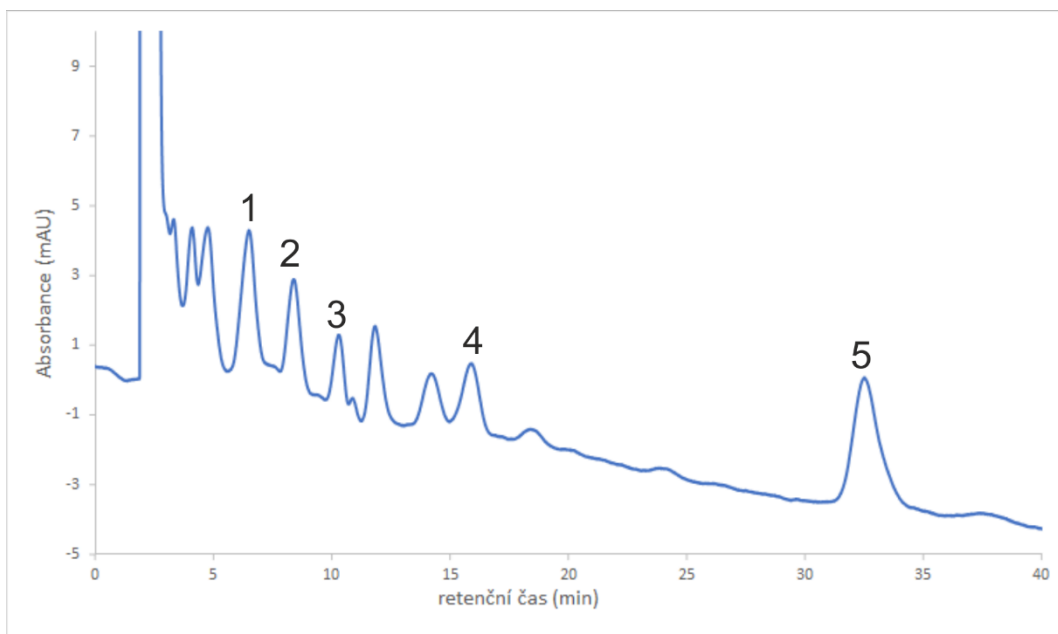
Obrázek 27 Kalibrační závislosti pro T-CA (dehydratace 15 min), G-CA (dehydratace 15 min) a T-CDCA (dehydratace 15 min). MF: methanol a vodný roztok pufru 50 mmol/l  $H_3PO_4/NaH_2PO_4$  o pH 2,5 (70/30) s přidavkem 50 mmol/l  $NaClO_4$ . Elektrochemická detekce: Pracovní elektroda BDDE, referenční Ag | 0,01 mol/l  $AgNO_3$ , 1 mol/l  $NaClO_4$  v acetonitrilu, pomocná platinová elektroda. Chybové úsečky odpovídají směrodatným odchylkám ze dvou opakovaných měření.

### 3.3.5 Měření látek ve směsi

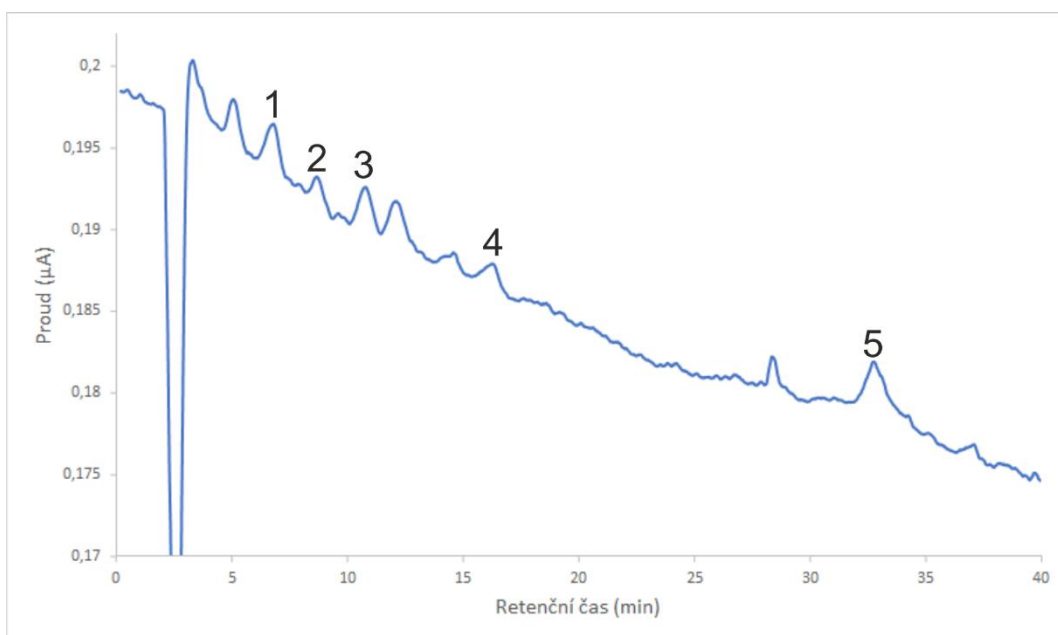
Směs CA, CDCA, T-CA, G-CA a T-CDCA o koncentraci látek  $9 \times 10^{-6}$  mol/l se úspěšně separovala na RP-HPLC C<sub>18</sub> koloně. Retenční časy jednotlivých látek byly dosti rozdílné na to, aby se látky separovaly až na základní linii. Jejich separace byla pozorovatelná jak na UV detektoru (obr. 28), tak amperometrickém detektoru (obr. 29).

V porovnání jsou UV a amperometrický detektor minimálně srovnatelné. Výhodou amperometrického detektoru by mohla být jeho selektivita detekce pouze elektrochemicky aktivních látek. V reálných vzorcích se totiž mohou vyskytovat i látky, které budou absorbovat v UV oblasti vlnových délek okolo 200 nm a můžou tak zabraňovat možnosti detekce, popřípadě stanovení jednotlivých žlučových kyselin a jejich konjugátů UV detektorem.

Důležitým krokem této metody je proces dehydratace žlučových kyselin a jejich konjugátů kyselinou chloristou. Bez této dehydratace totiž není možné látky detekovat, a to v případě CA a CDCA ani pomocí UV detektoru. Dehydratace při zahřátí na 50 °C musela být také vždy prováděna těsně před analýzou a dehydratované vzorky nebylo možné skladovat, jelikož proces dehydratace pravděpodobně probíhal i za laboratorní teploty a mohlo docházet k neznámým reakcím a přeměnám látek. Když byl vzorek ponechán stát po delší dobu, klesala intenzita signálu u obou detektorů.



Obrázek 28 UV chromatogram směsi T-CA (1), G-CA (2), T-CDCA (3), CA (4) a CDCA (5) po dehydrataci (50 °C, 15 min) o koncentraci  $9 \times 10^{-6}$  mol/l. MF: methanol a vodný roztok pufru 50 mmol/l  $H_3PO_4/NaH_2PO_4$  o pH 2,5 (70/30) s přidavkem 50 mmol/l  $NaClO_4$ . UV detektor: vlnová délka 200 nm.



Obrázek 29 ECD chromatogram směsi T-CA (1), G-CA (2), T-CDCA (3), CA (4) a CDCA (5) po dehydrataci (50 °C, 15 min) o koncentraci  $9 \times 10^{-6}$  mol/l. MF: methanol a vodný roztok pufru 50 mmol/l  $H_3PO_4/NaH_2PO_4$  o pH 2,5 (70/30) s přidavkem 50 mmol/l  $NaClO_4$ . Amperometrická detekce: Pracovní elektroda BDDE, referenční Ag | 0,01 mol/l  $AgNO_3$ , 1 mol/l  $NaClO_4$  v acetonitrilu, pomocná platinová elektroda.

## ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala vývojem HPLC-UV-ECD metody pro stanovení primárních žlučových kyselin (cholové a chenodeoxycholové) a jejich konjugátů s taurinem a glycinem. Tyto látky nejsou elektrochemicky aktivní, avšak po dehydrataci se elektrochemicky aktivními stávají.

Kyseliny cholová, chenodeoxycholová a její dehydratační produkt (VB-A-325) byly analyzovány pomocí diferenční pulzní voltametrie. Měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení, kde pracovní elektrodou byla buďto elektroda ze skelného uhlíku, anebo borem dopovaná diamantová elektroda, referenční elektrodou  $\text{Ag} \mid 0,01\text{M AgNO}_3, 1\text{M NaClO}_4$  v acetonitrilu a pomocnou platinová elektroda. Nejprve byl zkoumán vliv obsahu vody na voltametrický signál CA po dehydrataci v roztoku  $0,1\text{M HClO}_4$  v acetonitrilu. Bylo zjištěno, že intenzita proudového signálu poklesne zhruba jen o pětinu původní hodnoty s nárůstem obsahu vody na 30 % (v/v) a je tedy možné provádět analýzy i při tomto obsahu vody, který je vhodný pro separaci žlučových kyselin na reverzních fázích. Z kalibračních závislostí těchto látek získaných metodou DPV pro obě elektrody lze vyzorovat, že GCE má vyšší proudovou odezvu, která však vykazuje horší regresní parametry a také vyšší hodnoty meze detekce a meze stanovitelnosti nežli BDDE. Z tohoto důvodu byla pro elektrochemickou detekci po HPLC separaci zvolena BDDE.

Pro analýzu žlučových kyselin pomocí HPLC s UV a amperometrickou detekcí byla vyvinuta metoda, kde stacionární fází je oktadecylsilikagel a mobilní fáze se skládá z methanolu a vodného roztoku pufru  $50 \text{ mmol/l H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  o pH 2,5 v objemovém poměru 70 : 30 s přídatkem  $50 \text{ mmol/l NaClO}_4$ . Průtok mobilní fáze byl  $0,6 \text{ ml/min}$ . Za těchto podmínek se analyty ve směsi dělily až na základní linii. Parametry pro nastavení detektorů byly zjištěny experimentálně. Z absorpčních spekter jednotlivých žlučových kyselin a jejich konjugátů byla pro detekci nalezena jako vhodná vlnová délka  $200 \text{ nm}$ . Elektrochemický detektor byl sestaven z elektrochemické průtokové cely v tříelektrodovém zapojení s pracovní BDDE, na kterou byl přiváděn eluát z kolony, referenční elektrodou  $\text{Ag} \mid 0,01\text{M AgNO}_3, 1\text{M NaClO}_4$  a pomocnou platinovou elektrodou. Vhodný potenciál pracovní elektrody  $+1,2 \text{ V}$  byl určen z hydrodynamických voltamogramů jednotlivých analytů. Zásadní vliv na intenzitu signálů amperometrického i UV detektoru má doba dehydratace analytů. Jako nejvhodnější pro analýzu směsi žlučových kyselin byla zjištěna doba dehydratace  $15 \text{ min}$  při  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Kalibrační závislosti jednotlivých látek pro oba používané detektory byly lineární v koncentračním rozmezí  $1 \times 10^{-4}$ – $5 \times 10^{-6}$  mol/l pro CA, CDCA a VB-A-325 a  $5 \times 10^{-5}$ – $5 \times 10^{-6}$  mol/l pro T-CA, T-CDCA a G-CA. Meze detekce se pohybovaly v jednotkách  $\mu\text{mol/l}$  pro oba detektory. G-CDCA nemohla být detekována, jelikož neposkytovala odezvu ani na jednom z detektorů.

Výsledky získané v této práci ukazují, že potenciál elektrochemické detekce žlučových kyselin a jejich konjugátů může být značný díky její větší selektivitě v porovnání s UV detekcí. Lze předpokládat, že u reálných vzorků by elektrochemický detektor mohl do určité míry potlačit případný vliv elektrochemicky neoxidovatelných složek komplexní matrice interferujících s analyty při UV detekci. Další výzkum by tedy bylo vhodné zaměřit na analýzu reálných vzorků a optimalizaci podmínek jak jejich přípravy, tak samotné analýzy. Výhodou HPLC-ECD metody je její jednoduchost, nízká pořizovací cena a malé provozní náklady v porovnání s jinými komplexnějšími metodami.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] 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, *Electrochem. Commun.* 86 (2018) 99–103.
- [2] A.F. Hofmann, L.R. Hagey, Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 2461–2483.
- [3] A.F. Hofmann, K.J. Mysels, Bile salts as biological surfactants, *Colloids Surf.* 30 (1987) 145–173.
- [4] S. Erlinger, D. Dhumeaux, P. Berthelot, M. Dumont, Effect of inhibitors of sodium transport on bile formation in the rabbit, *Am. J. Physiol.-Leg. Content.* 219 (1970) 416–422.
- [5] A.J. Sanyal, J.I. Hirsch, E.W. Moore, Premicellar taurocholate enhances calcium uptake from all regions of rat small intestine, *Gastroenterology.* 106 (1994) 866–874.
- [6] I. Koop, M. Schindler, A. Bosshammer, J. Scheibner, E. Stange, H. Koop, Physiological control of cholecystokinin release and pancreatic enzyme secretion by intraduodenal bile acids., *Gut.* 39 (1996) 661–667.
- [7] M. Begley, C.G.M. Gahan, C. Hill, The interaction between bacteria and bile, *FEMS Microbiol. Rev.* 29 (2005) 625–651.
- [8] M. Makishima, Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids, *Science.* 284 (1999) 1362–1365.
- [9] T. Maruyama, Y. Miyamoto, T. Nakamura, Y. Tamai, H. Okada, E. Sugiyama, T. Nakamura, H. Itadani, K. Tanaka, Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298 (2002) 714–719.
- [10] S.M. Houten, M. Watanabe, J. Auwerx, Endocrine functions of bile acids, *EMBO J.* 25 (2006) 1419–1425.
- [11] M. Axelson, E. Ellis, B. Mörk, K. Garmark, A. Abrahamsson, I. Björkhem, B.-G. Ericzon, C. Einarsson, Bile acid synthesis in cultured human hepatocytes: support for an alternative biosynthetic pathway to cholic acid, *Hepatology.* 31 (2000) 1305–1312.
- [12] D.W. Russell, The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis, *Annu. Rev. Biochem.* 72 (2003) 137–174.
- [13] J.Y.L. Chiang, Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms, *J. Hepatol.* 40 (2004) 539–551.
- [14] J. Neshybová, Cholelitiáza, bakalářská práce, Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Praha 2006.
- [15] A.F. Hofmann, J. Sjövall, G. Kurz, A. Radomska, C.D. Scheingart, G.S. Tint, Z.R. Vlahcevic, K.D. Setchell, A proposed nomenclature for bile acids., *J. Lipid Res.* 33 (1992) 599–604.
- [16] A. Roda, A.F. Hofmann, K.J. Mysels, The influence of bile salt structure on self-association in aqueous solutions., *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6362–6370.
- [17] K.E. Bove, J.E. Heubi, W.F. Balistreri, K.D.R. Setchell, Bile Acid Synthetic Defects and Liver Disease: A Comprehensive Review, *Pediatr. Dev. Pathol.* 7 (2004) 315–334.
- [18] B. Stieger, J. Zhang, B. O'Neill, J. Sjövall, P.J. Meier, Differential Interaction of Bile Acids from Patients with Inborn Errors of Bile Acid Synthesis with Hepatocellular Bile Acid Transporters, *Eur. J. Biochem.* 244 (1997) 39–44.
- [19] B. Fischler, K. Bodin, H. Stjernman, M. Olin, M. Hansson, J. Sjövall, I. Björkhem, Cholestatic liver disease in adults may be due to an inherited defect in bile acid biosynthesis, *J. Intern. Med.* 262 (2007) 254–262.



- [20] M.J. Monte, J.J. Marin, A. Antelo, J. Vazquez-Tato, Bile acids: Chemistry, physiology, and pathophysiology, *World J. Gastroenterol. WJG*. 15 (2009) 804–816.
- [21] G. Kakiyama, W.M. Pandak, P.M. Gillevet, P.B. Hylemon, D.M. Heuman, K. Daita, H. Takei, A. Muto, H. Nittono, J.M. Ridlon, M.B. White, N.A. Noble, P. Monteith, M. Fuchs, L.R. Thacker, M. Sikaroodi, J.S. Bajaj, Modulation of the fecal bile acid profile by gut microbiota in cirrhosis, *J. Hepatol.* 58 (2013) 949–955.
- [22] G. a. D. Haslewood, Bile salt evolution, *J. Lipid Res.* 8 (1967) 535–550.
- [23] P.B. Savage, C. Li, U. Taotafa, B. Ding, Q. Guan, Antibacterial properties of cationic steroid antibiotics, *FEMS Microbiol. Lett.* 217 (2002) 1–7.
- [24] A.K. Bandyopadhyaya, N.M. Sangeetha, U. Maitra, Highly Diastereoselective Synthesis of the 1,1'-Binaphthol Unit on a Bile Acid Template, *J. Org. Chem.* 65 (2000) 8239–8244.
- [25] V.H. Soto Tellini, A. Jover, L. Galantini, N.V. Pavel, F. Mejjide, J. Vázquez Tato, New Lamellar Structure Formed by an Adamantyl Derivative of Cholic Acid, *J. Phys. Chem. B*. 110 (2006) 13679–13681.
- [26] V.H. Soto Tellini, A. Jover, F. Mejjide, J. Vázquez Tato, L. Galantini, N.V. Pavel, Supramolecular Structures Generated by a p-tert-Butylphenyl-amide Derivative of Cholic Acid: From Vesicles to Molecular Tubes, *Adv. Mater.* 19 (2007) 1752–1756.
- [27] S. Nath, U. Maitra, A Simple and General Strategy for the Design of Fluorescent Cation Sensor Beads <sup>†</sup>, *Org. Lett.* 8 (2006) 3239–3242.
- [28] A.P. Davis, J.-B. Joos, Steroids as organising elements in anion receptors, *Coord. Chem. Rev.* 240 (2003) 143–156.
- [29] S. Ghosh, A.R. Choudhury, Tayur.N. Guru Row, U. Maitra, Selective and Unusual Fluoride Ion Complexation by A Steroidal Receptor Using OH...F<sup>-</sup> and CH...F<sup>-</sup> Interactions: A New Motif for Anion Coordination?, *Org. Lett.* 7 (2005) 1441–1444.
- [30] M. Yoshii, M. Yamamura, A. Satake, Y. Kobuke, Supramolecular ion channels from a transmembrane bischolic acid derivative showing two discrete conductances, *Org. Biomol. Chem.* 2 (2004) 2619–2623.
- [31] A. Enhsen, W. Kramer, G. Wess, Bile acids in drug discovery, *Drug Discov. Today*. 3 (1998) 409–418.
- [32] Y. Zhao, Facial amphiphiles in molecular recognition: From unusual aggregates to solvophobic driven foldamers, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 12 (2007) 92–97.
- [33] M. Alvarez Alcalde, A. Jover, F. Mejjide, L. Galantini, N.V. Pavel, A. Antelo, J. Vázquez Tato, Synthesis and Characterization of a New *Gemini* Surfactant Derived from 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Dihydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-amine (Steroid Residue) and Ethylenediaminetetraacetic Acid (Spacer), *Langmuir*. 24 (2008) 6060–6066.
- [34] Nonappa, U. Maitra, Unlocking the potential of bile acids in synthesis, supramolecular/materials chemistry and nanoscience, *Org. Biomol. Chem.* 6 (2008) 657–669.
- [35] A.F. Hofmann, Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly, *Physiology*. 14 (1999) 24–29.
- [36] A. Coello, F. Mejjide, E.R. Núñez, J.V. Tato, Aggregation behavior of bile salts in aqueous solution, *J. Pharm. Sci.* 85 (1996) 9–15.
- [37] Cholic acid from bovine and/or ovine,  $\geq 98\%$  | Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/>, staženo 23. červen 2021.
- [38] PubChem, Cholic acid, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/221493>, staženo 22. červen 2021.
- [39] PubChem, Chenodeoxycholic acid, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10133>, staženo 23. červen 2021.

- [40] Chenodeoxycholic acid | Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/>, staženo 23. červen 2021.
- [41] PubChem, Taurocholic acid, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6675>, staženo 23. červen 2021.
- [42] Taurocholic acid sodium salt hydrate  $\geq 95\%$  (HPLC) | Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/>, staženo 23. červen 2021.
- [43] PubChem, Taurochenodeoxycholic acid, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/387316>, staženo 23. červen 2021.
- [44] Sodium taurochenodeoxycholate-2,2,3,4,4,6,6,7,8-d<sub>9</sub>  $\geq 98$  atom % D,  $\geq 98\%$  (CP) | Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/>, staženo 23. červen 2021.
- [45] PubChem, Glycocholic acid, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10140>, staženo 23. červen 2021.
- [46] Glycocholic acid hydrate synthetic,  $\geq 97\%$  (HPLC) | Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/>, staženo 23. červen 2021.
- [47] PubChem, Glycochenodeoxycholic acid, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12544>, staženo 23. červen 2021.
- [48] Glycochenodeoxycholic-2,2,4,4-d<sub>4</sub> acid 3-sulfate disodium salt  $\geq 98$  atom % D,  $\geq 98\%$  (CP) | Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/>, staženo 23. červen 2021.
- [49] G.M. Murphy, B.H. Billing, D.N. Baron, A fluorimetric and enzymatic method for the estimation of serum total bile acids, *J. Clin. Pathol.* 23 (1970) 594–598.
- [50] J. Ejderhamn, K. Samuelson, B. Strandvik, Serum primary bile acids in the course of celiac disease in children, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 14 (1992) 443–449.
- [51] H.J. Wildgrube, H. Stockhausen, P. Metz, G. Mauritz, R. Mahdawi, Radioimmunoassay of bile acids in tissue, bile, and urine., *Clin. Chem.* 29 (1983) 494–498.
- [52] J. SchÖLmerich, M. Deluca, M. Chojkier, Bioluminescence Assays for Bile Acids in the Detection and Follow-Up of Experimental Liver Injury, *Hepatology.* 4 (1984) 639–643.
- [53] W.J. Griffiths, J. Sjövall, Bile acids: analysis in biological fluids and tissues, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 23–41.
- [54] K.D.R. Setchell, A. Matsui, Serum bile acid analysis, *Clin. Chim. Acta.* 127 (1983) 1–17.
- [55] Y. Alnouti, I.L. Csanaky, C.D. Klaassen, Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC–MS/MS, *J. Chromatogr. B.* 873 (2008) 209–217.
- [56] S.S. Rossi, J.L. Converse, A.F. Hofmann, High pressure liquid chromatographic analysis of conjugated bile acids in human bile: simultaneous resolution of sulfated and unsulfated lithocholyl amidates and the common conjugated bile acids, *J. Lipid Res.* 28 (1987) 589–595.
- [57] 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, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 978–990.
- [58] K. Pecková, K. Nesměrák, Electrochemistry of bile acids, cholesterol, and related compounds (an overview), v knize: K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vytrás (ed.) *Sensing in Electroanalysis*, Vol. 7, University Press Centre, Pardubice (2012).
- [59] S. Scalia, S. Tirendi, P. Pazzi, E. Bousquet, Assay of free bile acids in pharmaceutical preparations by HPLC with electrochemical detection, *Int. J. Pharm.* 115 (1995) 249–253.
- [60] A. Medici, P. Pedrini, A. De Battisti, G. Fantin, M. Fogagnolo, A. Guerrini, Anodic electrochemical oxidation of cholic acid, *Steroids.* 66 (2001) 63–69.

- [61] J. Klouda, K. Nesměrák, P. Kočovský, J. Barek, K. Schwarzová-Pecková, A novel voltammetric approach to the detection of primary bile acids in serum samples, *Bioelectrochemistry*. 134 (2020) 107539.
- [62] K. Paskerová, Elektrochemická analýza cholesterolu, 7-dehydrocholesterolu a cholekalciferolu, diplomová práce, Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, Olomouc 2021.