

# VLIV SIMULOVANÉHO TRÁVENÍ NA SPECIACI PRVKŮ V ŽITNÝCH VLOČKÁCH

*Martin Juříček*

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6.

E-mail: [juricekm@vscht.cz](mailto:juricekm@vscht.cz)

## Úvod

Prvky obsažené v biologických materiálech mohou být přítomny v množství fyzikálně - chemických forem<sup>1</sup>. S ohledem na studium toxicity, biologické využitelnosti, hromadění a transportu stopových prvků v organismu je nezbytné mít o prvcích více informací než jen informaci o celkové koncentraci. Využitelnost prvků organismem je ovlivněna zejména jejich změnami v gastrointestinálním traktu. Vliv simulovaného trávení za podmínek *in vitro* na speciaci vybraných stopových kovů a fosforu byl zkoumán na vzorku rozemletých žitných vloček. Byla k tomu použita gelová permeační chromatografie<sup>2</sup> (SEC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).

## Experimentální část

*Chemikálie a činidla.* Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Tris)<sup>3</sup> použitý pro přípravu mobilní fáze a extrakčního činidla byl získán od firmy Fluka (Neu-Ulm, SRN). Kyselina dusičná (65%) čistoty Suprapur, stejně jako standardní roztoky Rh, Mn, Fe, Zn, Mo, Cu, Ni, Co, Cd a P pocházely od firmy Merck (Darmstadt, SRN). Trávicí enzym pepsin pocházel od firmy Fluka a směs pankreatických trávicích enzymů od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA). Pro úpravu hodnoty pH byly použity  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  čistoty p.a a roztok amoniaku čistoty Suprapur firmy Merck. Na přípravu a ředění všech roztoků byla použita destilovaná deionizovaná voda (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA).

*Vzorky.* Vzorek žitných vloček (PRO-BIO s.r.o., Staré Město p. S.) byl zakoupen v obchodní síti. Před stanovením byly vločky namlety ve vibračním mlýně. Nutriční hodnoty žitných vloček deklarované výrobcem byly 10,5 % bílkovin, 70,2 % sacharidů, 2 % lipidů, energie 1385 kJ/100 g.

*On-line spojení SEC a ICP-MS.* Aparatura<sup>4</sup> se skládá ze zásobníku mobilní fáze (0,02 mol/l roztok Tris-HCl, pH=7,5), vysokotlakého čerpadla Varian Inert 9012 (Varian, Walnut Creek, CA, USA) zajišťujícího průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, dále následuje čistící předkolona naplněná Chelexem 100 v  $\text{NH}_4^+$  cyklu. Za ní je umístěn nástřikový kohout s 100  $\mu\text{l}$  smyčkou pro nástřik vzorku, separační kolona Superdex 75 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko) a další nástřikový kohout a smyčka 200  $\mu\text{l}$  pro nástřik

kalibračních roztoků. Tok efluentu je pomocí T-kusu spojen s tokem roztoku porovnávacího prvku (50 µg/l Rh) a směs je nasávána peristaltickým čerpadlem do přístroje ICP-MS Elan 6000 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). Nástřik kalibračních roztoků kovů se provede během deseti minut po nástřiku vzorku v době před elucí prvních složek vzorku. Nástřik kalibračních roztoků fosforu se provede po 40. minutě, kdy eluce složek vzorku je již ukončena.

*Příprava extraktu.* Navážka 2 g rozemletých žitných vloček a 50 ml roztoku o stejném složení jako mobilní fáze<sup>5</sup> se třepe 1 hodinu při teplotě 20 °C. Vzniklá suspenze je odstředována 20 minut při 20 000 g a teplotě 4 °C

*Příprava digerátu.* Na rozemleté žitné vločky se aplikují trávící enzymy v prostředí, které odpovídá podmínkám v trávícího traktu. K navážce 2 g vloček se přidá 50 mg pepsinu a 40 ml 0,02 mol/l roztoku kyseliny chlorovodíkové (pH = 1,7) a směs se nechá třepat v inkubátoru 12 hodin při teplotě 37°C. Poté se směs ochladí na laboratorní teplotu a hodnota pH se přidavkem 1 mol/l roztoku NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a posléze zředěného roztoku NH<sub>3</sub> upraví na pH 7,5. Ke směsi se přidá 100 mg pankreatinu a opět se nechá třepat 12 hodin při teplotě 37 °C. Po této době se suspenze ochladí na laboratorní teplotu, převede se do 100 ml odměrné baňky a doplní se vodou po značku. Takto připravený digerát je odstředován 20 minut při 20 000 g a teplotě 4 °C

*Stanovení celkových obsahů prvků.* 0,5 g vloček nebo 10 ml extraktu nebo digerátu se převede do 110 ml PTFE nádoby, přidají se 3 ml konc. HNO<sub>3</sub> (Suprapur) a rozkládá<sup>6</sup> se v mikrovlnném mineralizátoru Uniclever BM1-Z (Plazmatronika-Service, Wrocław, Poland) po dobu 10 min. Poté se obsah kvantitativně převede do 50 ml odměrné baňky, přidá se porovnávací prvek (Rh) a doplní se po značku. Analýza se provede metodou ICP-MS.

## **Výsledky a diskuse**

Tabulka 1 obsahuje shrnuté údaje o celkových obsazích prvků v původním pevném vzorku, podíl přešlý do extraktu a podíl přešlý do digerátu. Je patrné, že zatímco vodorozpustný podíl prvků je poměrně nízký (6 – 41 %), podíl uvolněný do rozpustných forem během trávení je podstatně vyšší (50 – 100 %). Podíly prošlé chromatografickou kolonou uvedené v této tabulce vypovídají o obsahu stabilních komplexů v příslušně upravených vzorcích.

Obrázek 1 znázorňuje eluční křivky sloučenin sledovaných prvků v extraktu a digerátu žitných vloček. V případě fosforu si obě eluční křivky dobře odpovídají. Jsou zde patrné dva hlavní píky, jeden ve střední molekulární oblasti okolo 2,6 kDa a druhý v nízkomolekulární oblasti okolo < 1 kDa. Digescí se získá mnohem větší část specií P (93 % celkového obsahu)

než extrakcí (25 %). Také chromatografická výtěžnost vzhledem k obsahu prvku v extraktu resp. digerátu je vyšší v digerátu (93 %) oproti extraktu (76 %). Jinak je tomu v případě manganu. Vliv simulovaného trávení je sice přibližně stejný jako u sloučenin fosforu, extrakcí a digescí se získá 24 % resp. 99 % sloučenin Mn vůči celkovému obsahu. Chromatografická výtěžnost je však u extraktu i digerátu velice nízká, 0,4 % resp. 0,2 %. To je způsobeno nízkou stabilitou sloučenin manganu. Ionty manganu se uvolňují z původního roztoku a adsorbují se na gelu SEC kolony. Přesto je v roztoku extraktu patrný jeden ostrý pík v nízkomolekulární oblasti okolo  $< 1$  kDa a v roztoku digerátu jeden širší pík ve vysokomolekulární oblasti odpovídající hodnotě relativní molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa. Eluční křivky sloučenin železa rovněž ukazují na určitý vliv simulovaného trávení na tyto specie. Po digesci přechází do roztoku přibližně polovina celkového obsahu železa, kdežto po extrakci pouze asi 6 % celkového železa. Digerát poskytuje jeden velký pík odpovídající frakci o relativní molekulové hmotnosti cca 35 kDa s výtěžností 88 %. Nízká citlivost detektoru neumožňuje v roztoku extraktu rozpoznat jakýkoli pík. V případě niklu extrakt poskytuje jeden velký pík frakce o relativní molekulové hmotnosti  $< 1$  kDa, přičemž dosahuje chromatografické výtěžnosti 100 %. Digerát navíc ještě obsahuje jeden menší širší pík v oblasti cca 4 kDa a dosahuje také dobré chromatografické výtěžnosti 92 %. Relativní obsahy sloučenin Ni v extraktu a digerátu jsou 15 % resp. 52 % celkového obsahu niklu ve vzorku. Sloučeniny mědi v extraktu jsou obsaženy v jediné frakci o relativní molekulové hmotnosti  $< 1$  kDa s chromatografickou výtěžností 81 %. Sloučeniny mědi v digerátu jsou distribuovány ve dvou frakcích, jedna totožná s frakcí extraktu, druhá, o přibližně dvojnásobném obsahu Cu, spadá do vysokomolekulární oblasti 50 kDa, které odpovídá širší symetrický pík. Celková chromatografická výtěžnost mědi z digerátu je nižší, dosahuje hodnoty necelých 63 %. Relativní obsah mědi v extraktu vůči celkovému obsahu je 22 %, v digerátu dosahuje 53 % celkového obsahu. V případě zinku Extrakt i digerát mají společný jeden ostrý vysoký pík v nízkomolekulární oblasti ( $< 1$  kDa). Digerát navíc ještě obsahuje tři malé frakce odpovídající relativním molekulovým hmotnostem 60 kDa, 4 kDa a 1 kDa. Specie sloučenin zinku je procesem trávení ovlivněna nejvíce ze všech stanovovaných prvků. V extraktu je relativní obsah zinku 7 % celkového obsahu, v digerátu je to téměř 75 %. Chromatografické výtěžnosti však mají opačný trend, u extraktu dosahuje tento parametr hodnoty 53 %, u digerátu je to pouze 10 %. Eluční křivky molybdenu se rovněž velmi dobře navzájem shodují. Extrakt i digerát poskytují jeden ostrý pík v nízkomolekulární oblasti okolo hodnoty relativní molekulové hmotnosti 1 kDa. V extraktu je relativní obsah molybdenu 42 %, v digerátu 62 % celkového obsahu molybdenu. Chromatografické výtěžnosti extraktu

i digerátu dosahují vysokých hodnot, 100 % resp. 94 %. Ostatní stanovované prvky se ve vzorku nacházely v nízké koncentraci a poskytovaly velmi slabý signál.

Tabulka 1: Prvkové složení žitných vloček (údaje vyjádřeny v  $\mu\text{g/g}$ )

|                           | <b>P</b>      | <b>Mn</b>        | <b>Fe</b>      | <b>Co</b>      | <b>Ni</b>       | <b>Cu</b>      | <b>Zn</b>      | <b>Mo</b>       | <b>Cd</b>       | <b>Pb</b>       |
|---------------------------|---------------|------------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Celkový obsah             | 3040          | 17,85            | 25,49          | 0,005          | 0,250           | 3,576          | 34,10          | 2,002           | 0,007           | 0,018           |
| Extrahovatelný podíl*     | 772<br>(25%)  | 4,27<br>(24 %)   | 1,580<br>(6 %) | 0,001<br>(29%) | 0,039<br>(16 %) | 0,786<br>(22%) | 2,548<br>(8 %) | 0,834<br>(42 %) | 0,002<br>(27 %) | 0,005<br>(30 %) |
| Podíl prošlý kolonou **   | 585<br>(76%)  | 0,013<br>(0,4%)  |                |                | 0,051<br>(110%) | 0,653<br>(81%) | 1,329<br>(53%) | 0,872<br>(104%) |                 |                 |
| Podíl přešlý do digerátu* | 2829<br>(76%) | 17,79<br>(100%)  | 12,69<br>(50%) | 0,003<br>(52%) | 0,130<br>(52%)  | 1,910<br>(53%) | 25,04<br>(73%) | 1,250<br>(62%)  | 0,006<br>(75%)  | 0,017<br>(93%)  |
| Podíl prošlý kolonou***   | 2639<br>(93%) | 0,029<br>(0,2 %) | 11,2<br>(88%)  |                | 0,160<br>(93 %) | 1,305<br>(68%) | 2,623<br>(11%) | 1,200<br>(95%)  |                 |                 |

\*relativní údaje jsou vztaženy k celkovému obsahu

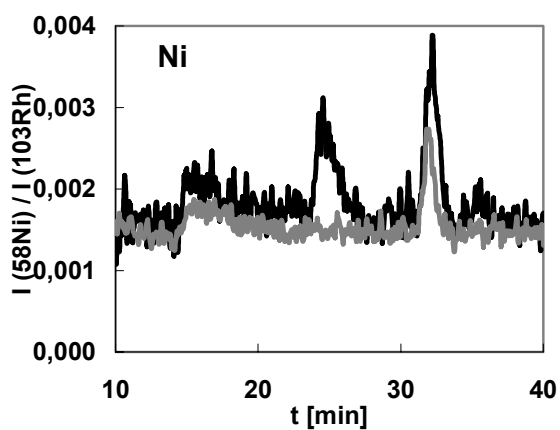
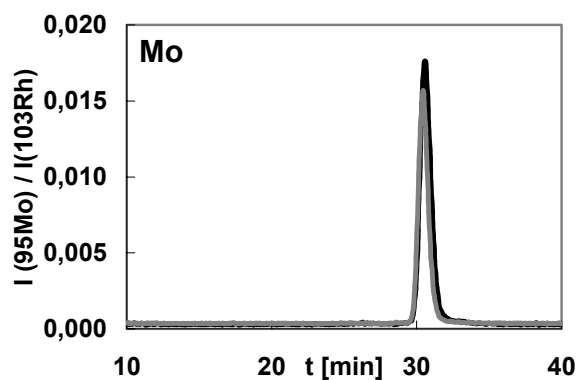
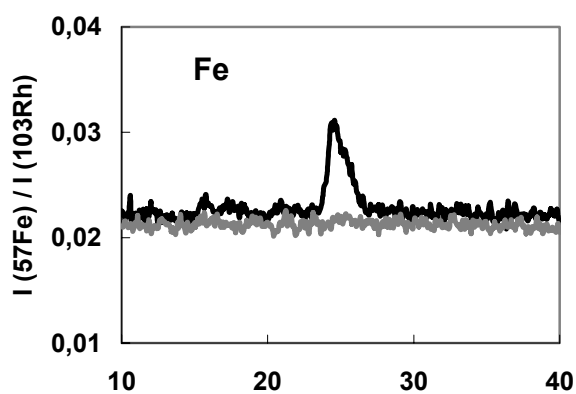
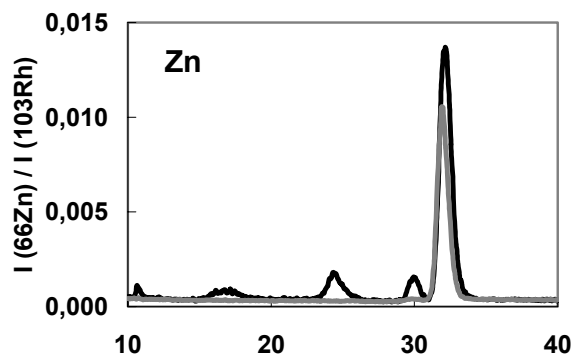
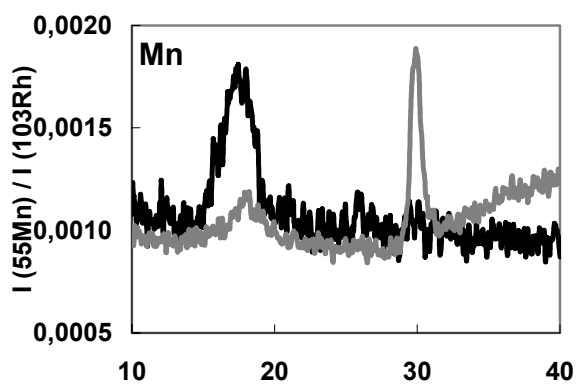
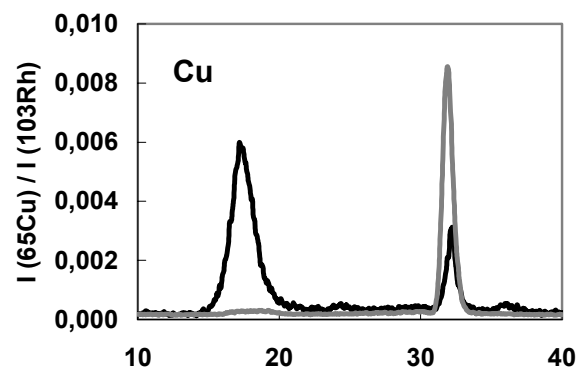
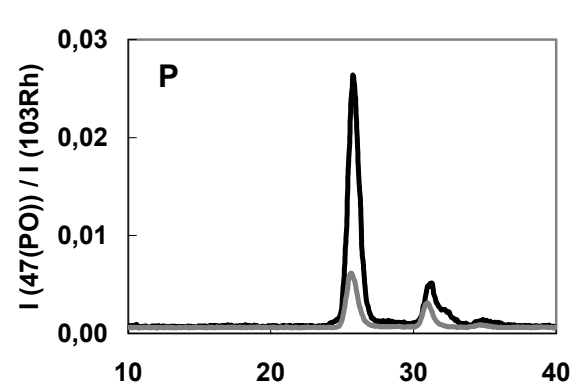
\*\*relativní údaje vztaženy k extrahovatelnému podílu

\*\*\* relativní údaje vztaženy k podílu přešlému do digerátu

Je patrné, že do digerátu přechází vyšší podíl prvků než do extraktu, což je způsobeno uvolněním prvků z vazby na makromolekuly (proteiny a polysacharidy) v důsledku jejich štěpení trávicími enzymy. Porovnáním retenčních časů specií jednotlivých prvků v digerátu a extraktu je patrné, že některé specie prvků Ni, Zn, Fe a Cu mají stejné retenční časy. Jedná se o specie Ni a Zn ( $t_R = 16,75$  min), Fe a Ni ( $t_R = 24,55$  min) a Ni, Cu a Zn ( $t_R = 32,15$  min). Lze tedy předpokládat, že tyto prvky mohou být vázány v extraktu i v digerátu na stejné ligandy. Může se jednat o komplexy<sup>7</sup> bílkovin a peptidů.

## Literatura

1. Koplík R., Čurdová E., Mestek O.: Chem. Listy 91, 38 (1997).
2. Štulík K. a kol.: *Analytické separační metody*, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2004.
3. Koplík R., Borková M., Mestek O.: Aplikace metody LC/ICP-MS ve speciální analýze: současné možnosti a problémy. Sborník Mikroelementy 2002, str. 62-66, 2Theta, Český Těšín 2002.
4. Koplík R., Borková M., Mestek O., Komínková J., Suchánek M.: J. Chromatogr. B 775, 179 (2002).
5. Koplík R., Pavelková H., Cincibuchová J., Mestek O., Kvasnička F., Suchánek M.: J. Chromatogr. B 770, 261 (2002).
6. Koplík R., Borková M., Bicanová B., Polák J., Mestek O., Komínková J.: Food Chem. 99, 158 (2006).
7. Velíšek J.: *Chemie potravin 2*. Osis, Tábor 2002.



Obrázek 1

Eluční křivky sloučenin sledovaných prvků  
v digerátu (šedá čára) a extraktu (černá čára)