

VLIV SIMULOVANÉHO TRÁVENÍ NA SPECIACI PRVKŮ V ŽITNÝCH VLOČKÁCH*

MARTIN JUŘÍČEK^a, RICHARD KOPLÍK^b
a OTO MESTEK^a

^a Ústav analytické chemie, ^b Ústav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
oto.mestek@vscht.cz

Došlo 24.4.07, přijato 8.1.08.

Klíčová slova: stopové prvky, speciace, ICP-MS, žitné vločky

Úvod

Prvky obsažené v biologických materiálech mohou být přítomny v mnoha fyzikálních a chemických formách¹. 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 celkovém obsahu. Odpovědi na tyto otázky může dát speciální analýza. Původní chemická speciace prvků v potravinových surovinách může být změněna během výroby potravin, zejména během tepelného zpracování, které způsobuje denaturaci metaloproteinů a jiných metabolomolekul a mohou se změnit rozpustnosti prvků². Tyto změny jsou doprovázeny uvolněním iontů kovů z chelátů s organickými ligandy. K nejpodstatnějším chemickým změnám ve struktuře specií kovů však dochází během trávicích procesů probíhajících v gastrointestinálním traktu. Přesto počet dosud publikovaných prací zabývajících se těmito změnami je minimální. Tak např. byl sledován podíl železa vázaného v hemu a železnatých a železitých iontů ve směsi vzniklé simulovaným trávením různých typů stravy ze školních jídelen ve Španělsku³ nebo podíl celkového a anorganicky vázaného arsenu v roztoku po simulovaném trávení různých mořských řas⁴. Další publikovaná studie se týká také speciace arsenu: iontově výměnnou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) byl sledován obsah různých specií po enzymové digesti různých typů dětské výživy⁵.

Cílem této úvodní studie je zkoumat vliv simulovaného trávení za podmínek *in vitro* na speciaci vybraných

stopových kovů a fosforu ve vzorku rozemletých žitných vloček. Jedná se o potravinu, která se běžně konzumuje i bez tepelné úpravy. Vhodnou metodou pro speciální analýzu prvků v biologických matricích je kapalinová chromatografie se selektivní detekcí prvků. Pro speciální frakcionaci prvků v luštěninách^{6,7} a obilovinách⁸ se osvědčilo spojení gelové permeační chromatografie (SEC) a ICP-MS.

Experimentální část

Chemikálie a činidla

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) 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). Vepřový pepsin pocházel od firmy Fluka a vepřový pankreatin (tj. směs pankreatických trávicích enzymů) od firmy Sigma (St. Louis, USA). Pro úpravu pH byly použity NH_4HCO_3 čistoty p.a a roztok amoniaku čistoty Suprapur firmy Merck. K přípravě a ředění všech roztoků byla použita destilovaná demineralizovaná voda (Milli-Q, Millipore, Bedford, USA).

Vzorek

Vzorek žitných vloček (Pro-Bio s.r.o., Staré Město pod Smrkem) 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, využitelná energie 1385 kJ/100 g.

Příprava natráveného vzorku

K navážce 2 g rozemletých vloček v polypropylenové nádobce 60 ml bylo přidáno 40 ml $0,02 \text{ mol l}^{-1}$ HCl a 50 mg pepsinu. Po uzavření byla nádobka protřepávána po dobu 12 h při teplotě 37 °C. Poté byla směs ochlazená a pH suspenze bylo upraveno přidávkou roztoku 1 mol l^{-1} NH_4HCO_3 a 1 mol l^{-1} amoniaku na hodnotu 7,5. Po přidávku 100 mg pankreatinu a uzavření nádoby následovala opět inkubace při 37 °C po dobu 12 h. Vzniklá suspenze byla po ochlazení převedena do polypropylenové odměrné baňky 100 ml a doplněna demineralizovanou vodou po značku. Směs byla odstředěna (20 000 g, 20 min, 4 °C) a horní vrstva byla použita k dalším analýzám.

* Tato práce byla úspěšně prezentována v soutěži O cenu firmy Merck 2007 za nejlepší studentskou vědeckou odbornou práci v oboru analytická chemie.

Příprava extraktu

Vzorek rozemletých vloček (2 g) byl v polypropylenové lahvičce extrahován třepáním s 50 ml tlumivého roztoku 0,02 mol l⁻¹ Tris-HCl (pH 7,5) při teplotě 20 °C. Suspenze byla odstředěna (20 000 g, 20 min, 4 °C) a horní vrstva byla použita k dalším analýzám.

Stanovení celkových obsahů prvků

Vzorek vloček (0,5 g) resp. extraktu nebo natráveného vzorku (10 ml) byl mineralizován 3 ml konc. HNO₃ tlakovým mikrovlnným rozkladem v nádobce z PTFE (110 ml) v mineralizátoru Uniclever BM1-Z (Plazmatronika-Service, Wrocław, Polsko) po dobu 10 min. Obsah rozkladné nádoby byl poté převeden do odměrné baňky 50 ml a doplněn demineralizovanou vodou po značku. Před stanovením stopových prvků metodou ICP-MS (cit.⁹) byly mineralizáty vzorků a příslušné slepé vzorky zředěny a k roztokům byl přidán srovnávací roztok prvků (Ge, Rh, In a Bi) v takovém množství, aby výsledná koncentrace těchto prvků činila 50 µg l⁻¹.

On-line spojení gelové permeační chromatografie a ICP-MS

Aparatura se skládala z vysokotlakého čerpadla Varian Inert 9012 (Varian, Walnut Creek, USA) zajišťujícího průtok mobilní fáze (0,02 mol l⁻¹ roztok Tris-HCl, pH 7,5) 0,5 ml min⁻¹, skleněné předkolony s náplní Chelex 100 v NH₄⁺ cyklu, prvního injektoru (pro nástřik vzorku) se smyčkou 100 µl z materiálu PEEK, separační kolony Superdex 75 o rozměrech 300×10 mm (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko), druhého injektoru (pro nástřik kalibračních roztoků) se smyčkou 200 µl z polymeru PEEK a z detektoru ICP-MS (spektrometr Elan 6000, Perkin-Elmer, Norwalk, USA), Tok efluentu

z chromatografické kolony byl T-kusem spojen s tokem srovnávacího roztoku (50 µg l⁻¹ Rh) a směs byla dopravována peristaltickým čerpadlem (průtok 1,3 ml min⁻¹) do pneumatického zmlžovače ICP-MS. Ke spojení jednotlivých částí aparatury byly použity kapiláry z polymerních materiálů PTFE a PEEK. Nástřik kalibračních roztoků kovů se provedl během prvních deseti minut po nástřiku vzorku před elucí prvních složek vzorku z kolony. Nástřik kalibračních roztoků fosforu se provedl ve 40. minutě od nástřiku vzorku, kdy byla eluce složek vzorku již ukončena. Podrobnosti lze nalézt v pracích^{6,10}.

Výsledky a diskuse

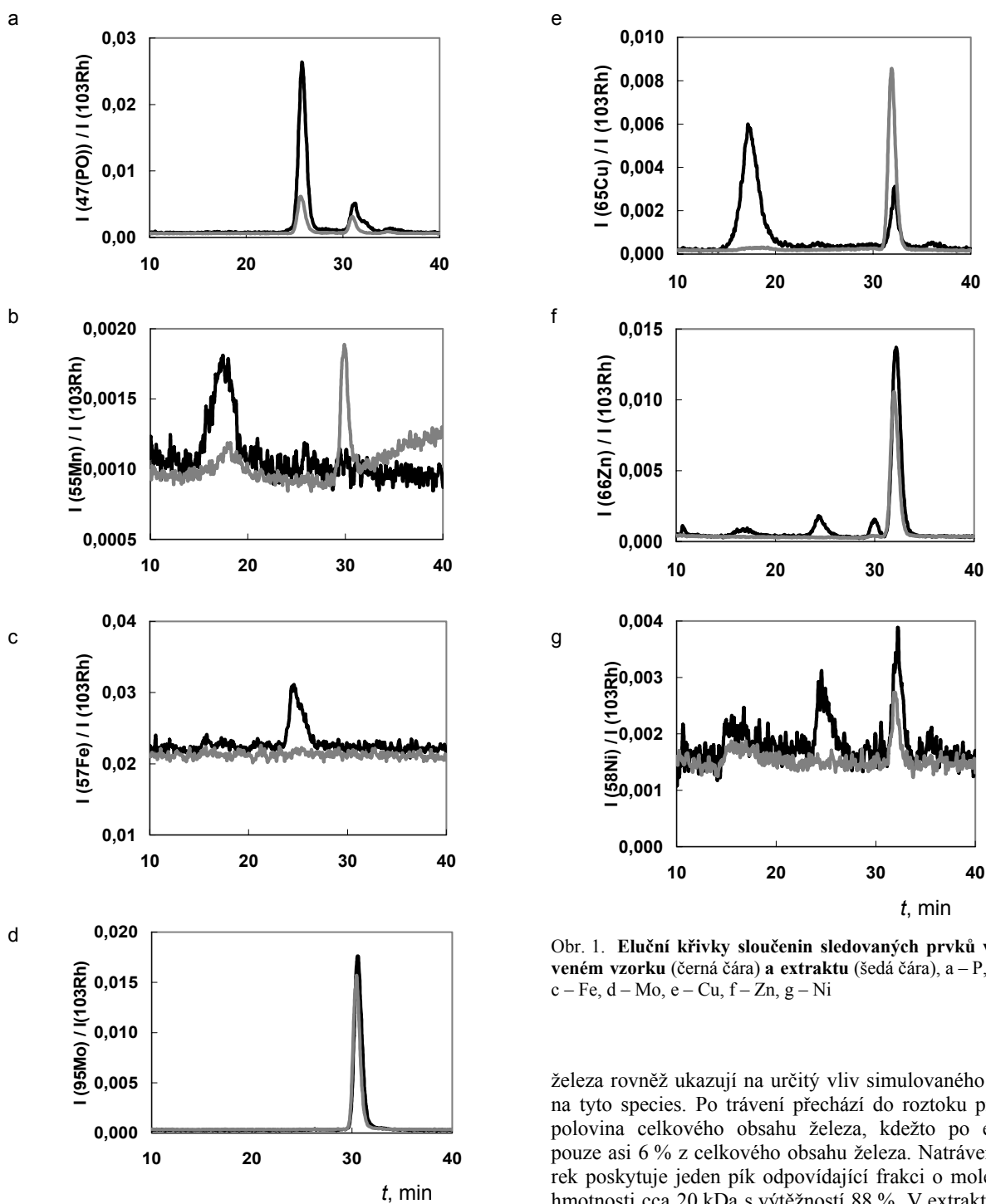
Tabulka I shrnuje údaje o celkovém obsahu prvků v původním pevném vzorku, podílu přešlém do extraktu a podílu přešlém do natráveného vzorku. Je patrné, že zatímco podíl prvků rozpustných v tlumivém roztoku je poměrně nízký (6–42 %), podíl převedený během trávení do rozpustných forem je podstatně vyšší (50–99 %). Podíly prošlé chromatografickou kolonou vypovídají o zastoupení stabilních komplexů v příslušně upravených vzorcích.

Obr. 1 znázorňuje eluční křivky sloučenin sledovaných prvků v extraktu a natráveném vzorku žitných vloček. U fosforu si obě eluční křivky dobře odpovídají. Jsou zde patrné dva hlavní píky, jeden v oblasti středních molekulových hmotností (cca 5 kDa), druhý v nízkomolekulární oblasti (cca 2 kDa). Trávením přejde do roztoku mnohem větší část specií fosforu (93 % celkového obsahu) než extrakcí (25 %). Také chromatografická výtěžnost vztažená na obsah prvku v extraktu resp. natráveném vzorku je vyšší v natráveném vzorku (93 %) proti extraktu (76 %). Jinak je tomu v případě manganu. Vliv simulovaného trávení je sice přibližně stejný jako u sloučenin fosforu (extrakcí a trávením je solubilizováno 24 % resp. 99 % celkového Mn), chromatografická výtěžnost je však velice

Tabulka I
Elementární složení žitných vloček (v µg g⁻¹)

	P	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Mo	Cd	Pb
Celkový obsah	3040	17,9	25,5	0,005	0,250	3,58	34,0	2,00	0,007	0,018
Podíl extrahovatelný do 0,02 mol l ⁻¹ Tris-HCl (pH 7,5) ^a	772 (25 %)	4,27 (24 %)	1,58 (6 %)	0,001 (20 %)	0,039 (16 %)	0,786 (22 %)	2,55 (8 %)	0,834 (42 %)	0,002 (29 %)	0,005 (27 %)
Podíl prošlý SEC kolonou ^b	585 (76 %)	0,013 (0,3 %)	n.d.	n.d.	0,043 (110 %)	0,653 (83 %)	1,33 (52 %)	0,872 (104 %)	n.d.	n.d.
Podíl uvolněný trávením	2830 (93 %)	17,8 (99 %)	12,7 (50 %)	0,003 (52 %)	0,130 (52 %)	1,91 (53 %)	25,0 (74 %)	1,25 (62 %)	0,006 (85 %)	0,017 (94 %)
Podíl prošlý SEC kolonou ^c	2640 (93 %)	0,029 (0,2 %)	11,2 (88 %)	n.d.	0,150 (115 %)	1,31 (69 %)	2,63 (11 %)	1,20 (96 %)	n.d.	n.d.

^a Procenta jsou vztažena k celkovému obsahu; ^b procenta jsou vztažena k obsahu v extraktu; ^c procenta jsou vztažena k obsahu v natráveném vzorku; n.d.: obsah prvku nebyl detegován



Obr. 1. Eluční křivky sloučenin sledovaných prvků v natráveném vzorku (černá čára) a extraktu (šedá čára), a – P, b – Mn, c – Fe, d – Mo, e – Cu, f – Zn, g – Ni

nízká (<1 %). Je to způsobeno malou stabilitou komplexních sloučenin manganu. Ionty manganu z původního roztoku se adsorbují na gelové náplni kolony. Přesto je v extraktu patrný jeden ostrý pík v nízkomolekulární oblasti (<2 kDa) a v roztoku natráveného vzorku jeden širší pík ve vysokomolekulární oblasti. Eluční křivky sloučenin

železa rovněž ukazují na určitý vliv simulovaného trávení na tyto species. Po trávení přechází do roztoku přibližně polovina celkového obsahu železa, kdežto po extrakci pouze asi 6 % z celkového obsahu železa. Natrávený vzorek poskytuje jeden pík odpovídající frakci o molekulové hmotnosti cca 20 kDa s výtěžností 88 %. V extraktu nebyl detegován žádný pík sloučenin železa. U niklu extrakt poskytuje jediný pík nízkomolekulární frakce (<2 kDa). Chromatogram natráveného vzorku obsahuje navíc ještě další pík sloučenin niklu v oblasti okolo 20 kDa. V důsledku kontaminace při manipulaci se vzorkem chromatografická výtěžnost niklu mírně přesahuje 100 %. Podíly rozpustných sloučenin niklu v extraktu a natráveném vzorku jsou 16 % a 52 % z celkového obsahu niklu ve

vzorku. Sloučeniny mědi v extraktu jsou obsaženy v jediné nízkomolekulární (<2 kDa) frakci, přičemž jejich chromatografická výtěžnost činí 83 %. V natráveném vzorku je měď rozdělena do dvou frakcí: první je totožná s frakcí v extraktu, druhá, o přibližně dvojnásobném obsahu Cu, spadá do vysokomolekulární oblasti (cca 120 kDa). Celková chromatografická výtěžnost mědi v natráveném vzorku je nižší (69 %). Podíl rozpustných sloučenin mědi v extraktu a natráveném vzorku představuje přibližně jednu pětinu resp. jednu polovinu celkového obsahu mědi. U zinku mají extrakt i natrávený vzorek společný jeden ostrý pík v nízkomolekulární oblasti (<2 kDa). Natrávený vzorek navíc obsahuje další tři menší frakce sloučenin zinku. Specie sloučenin zinku je procesem trávení ovlivněna nejvíce ze všech stanovovaných prvků. V extraktu představuje rozpustný podíl zinku 8 % celkového obsahu Zn, v natráveném vzorku je to 74 %. Chromatografické výtěžnosti však mají opačný trend, v extraktu dosahuje tento parametr hodnoty 52 %, v natráveném vzorku je to pouze 11 %. Eluční křivky molybdenu se velmi dobře shodují. Extrakt i natrávený vzorek poskytují jeden ostrý pík v nízkomolekulární oblasti (cca 2–3 kDa). Rozpustný podíl molybdenu v extraktu činí 42 % a v natráveném vzorku 62 % z celkového obsahu. Chromatografické výtěžnosti molybdenu se blíží 100 %. Ostatní stanovované prvky se v natráveném vzorku a zejména extraktu vzorku nacházely v nízkých koncentracích a poskytovaly velmi slabé signály, které neumožňovaly správnou kvantifikaci.

Je patrné, že do natráveného vzorku přechází vyšší podíl prvků než do extraktu, což je způsobeno uvolněním prvků vázaných na biopolymery v důsledku jejich štěpení trávicími enzymy. Srovnáním retenčních časů specií jednotlivých prvků v natráveném vzorku a extraktu je patrné, že některé species Ni, Zn, Fe a Cu mají stejné retenční časy. Jedná se o specie Ni a Zn ($t_R = 16,8$ min), Fe a Ni ($t_R = 24,6$ min) a Ni, Cu a Zn ($t_R = 32,2$ min). Lze tedy předpokládat, že tyto prvky mohou být vázány v extraktu i v natráveném vzorku na stejný ligandy.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT ČR MSM 6046137307.

LITERATURA

1. Koplík R., Čurdová E., Mestek O.: Chem. Listy 91, 38 (1997).
2. Koplík R., Mestek O., Komínková J., Borková M., Suchánek M.: Food Chem. 85, 31 (2004).
3. Cámara F., Amaro F. A., Barberá R., Lagarda M. J.: Eur. Food Res. Technol. 221, 768 (2005).
4. Laparra J. M., Vélez D., Montoro R., Barberá R., Farré R.: J. Agric. Food Chem. 51, 6080 (2003).
5. Pardo Martínez M., Vinas P., Fischer A., Hill S. J.: Anal. Chim. Acta 441, 29 (2001).
6. Koplík R., Borková M., Mestek O., Komínková J., Suchánek M.: J. Chromatogr., B 775, 179 (2002).
7. Mestek O., Komínková J., Koplík R., Borková M., Suchánek M.: Talanta 57, 1133 (2002).
8. Koplík R., Borková M., Bicanová B., Polák J., Mestek O., Komínková J.: Food Chem. 99, 158 (2006).
9. Koplík R., Čurdová E., Suchánek M.: Fresenius' J. Anal. Chem. 360, 449 (1998).
10. Koplík R., Pavelková H., Cincibuchová J., Mestek O., Kvasnička F., Suchánek M.: J. Chromatogr., B 770, 261 (2002).

M. Juříček, R. Koplík, and O. Mestek (*Institute of Chemical Technology, Prague*): **The Effect of Simulated Digestion on Element Speciation in Rye Flakes**

To investigate element speciation in digested rye flakes, a simulated digestion using pig's pepsin and pancreatin was performed at 37 °C. The digest was analyzed by SEC/ICP-MS (Superdex 75, 0.02 mol l⁻¹ Tris-HCl buffer). Most elements in flakes are solubilized by enzymatic hydrolysis. P and Mo recoveries in SEC analysis of the digest approach to 100 %, those of Fe and Cu range from 60 to 80 % and that of Zn varies from 10 to 40 %. Ionic species or labile complexes were not recovered. The proportions of elements change as a result of enzyme digestion. No Fe is recovered in SEC analysis of flake extracts. Most Fe in the digest is bonded to a medium-molecular-weight fraction. Low-molecular-weight (<2 kDa) fractions with bonded Cu and Zn partly persist in the digest.