

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA SPECIÍ JODU V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH SPOJENÍM VYLUČOVACÍ CHROMATOGRRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM

LUCIE HRUBÁ*, ANTONÍN KAŇA a OTO
MESTEK

Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická
5, 166 28 Praha 6
kanaa@vscht.cz

Došlo 26.9.14, přijato 18.11.14.

Klíčová slova: speciální analýza, jod, ICP-MS, kvantifikace

Úvod

Rozvoj využití spojení separačních technik (kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza, atd.) a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) v oblasti proteomiky a metalomiky je v posledních letech soustředěn zejména na kvantitativní stanovení proteinů¹. Jelikož pro detekci a stanovení proteinů pomocí ICP-MS nelze využít jejich majoritní prvky, jako jsou uhlík, vodík, dusík a kyslík, je stanovení omezeno na heteroatomy přítomné v molekulách². Těmi jsou v první řadě síra a fosfor³, dále pak např. jod nebo selen⁴. V případě metaloproteinů lze využít také přítomnost kovů⁵ a polokovů⁶, kterými jsou např. molybden, zinek, měď, železo nebo křemík. Prostřednictvím uvedených prvků může být obsah proteinů stanoven s vysokou citlivostí a přesností. Proteiny, které přirozeně neobsahují žádný vhodný heteroatom, na základě kterého by mohly být stanoveny metodou ICP-MS, pak mohou být uměle označeny, např. komplexem india s 1,4,7,10-tetraazacyklo-dodekan-*N,N',N'',N'''*-tetraoctovou kyselinou (In-DOTA)⁷. Výhodou ICP-MS je možnost monitorovat několik prvků současně a stanovit tak simultánně specie, které obsahují různé heteroatomy. Další výhodou je možnost měření isotopových poměrů, což umožňuje kvantifikaci specií metodou postkolonového isotopového zředování⁸.

Důležitými kritérii ovlivňujícími kvantitativní stanovení pomocí ICP-MS jsou především citlivost měření,

přesnost a preciznost stanovení. Citlivost měření, nejen proteinů, ale všech biomolekul, prostřednictvím heteroatomů závisí nejen na zastoupení isotopů měřeného prvku a na účinnosti jeho ionizace v plazmatu⁹, ale také na počtu atomů daného prvku v měřené molekule. Ten může být, zvláště u vysokomolekulárních proteinů, vysoký a je tak možné dosáhnout velmi nízkých detekčních limitů i při využití prvků s nízkou účinností ionizace (např. fosfor, síra). Zinn a spol.¹⁰ dosáhl na základě měření obsahu síry meze detekce pro ovalbumin (22 atomů síry v molekule) 249 nmol l⁻¹ a pro albumin (40 atomů síry v molekule) 141 nmol l⁻¹.

Abychom při přepočtu naměřeného množství prvku na množství proteinu získali přesné výsledky, je nezbytné znát obsah prvku v proteinu nebo stechiometrii přítomného biokonjugátu¹¹. V případě konjugátu pak musí být zajištěna jeho stabilita během stanovení. Je zřejmé, že u neznámých specií, pro které není k dispozici standard, lze stanovit pouze distribuci měřeného prvku mezi jednotlivé specie, nikoliv však jejich absolutní množství. To lze pouze za použití doplňkových metod, např. MALDI-MS atd. Problematika stanovení biomolekul technikou ICP-MS byla popsána v několika přehledových člancích, které se však zaměřují na speciální problematiku kvantitativního stanovení biomolekul synteticky značených heteroatomem^{11,12}, nebo se zabývají kvantitativním stanovením proteinů jen okrajově^{1,2}.

Cílem této práce bylo optimalizovat metodiku stanovení specií jodu v extraktech vzorků živočišných tkání spojením vylučovací chromatografie s ICP-MS a na speciích jodu demonstrovat a diskutovat faktory ovlivňující jejich stanovení uvedenou metodou.

Experimentální část

Instrumentace

Separace specií jodu probíhala na chromatografickém systému složeném z pumpy Series 200 (Perkin Elmer, Shelton, USA), ventilu Rheodyne 9025 se 100 μl dávkovací smyčkou před kolonou pro nástřik vzorku, kolony Superdex 75 GL (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Švédsko) o rozměrech 300 × 10 mm s optimálním rozsahem dělení 3–70 kDa a exkluzním limitem 100 kDa a ventilu Rheodyne 9025 s 215 μl dávkovací smyčkou za kolonou pro postkolonovou kalibraci. Měření metodou ICP-MS byla prováděna pomocí spektrometru s indukčně vázaným plazmatem ELAN DRC-e (Perkin Elmer, Concord, Kanada). Pevné vzorky byly rozkládány v mikrovlnném rozkladném zařízení Uniclever BM1-Z (Plazmatronika, Polsko) v teflonových nádobkách, případ-

* Tato práce byla prezentována na soutěži O cenu firmy Merck za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie v Pardubicích ve dnech 5. až 6. 2. 2014.

ně byly homogenizovány dispergátorem UltraTurrax T10 basic s nástavcem S10N-10G (IKA, SRN). K odstředování sloužila centrifuga MPW 211 (MPW Med. Instruments, Varšava, Polsko).

Reagencie

Pro dosažení optimální chromatografické separace byly testovány tři mobilní fáze: 20 mmol l⁻¹ tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl (Tris-HCl) (Fluka-Chemie, Neu-Ulm, SRN) o pH 7,5, 10 mmol l⁻¹ Tris-HCl s 20 mmol l⁻¹ NaCl (Suprapur, Merck, Darmstadt, SRN) o pH 7,5 a 10 mmol l⁻¹ Tris-HCl s 0,2% methanolem (Lichrosolv, Merck, Darmstadt, SRN) o pH 7,5. Hodnota pH všech mobilních fází byla upravena pomocí 30% kyseliny chlorovodíkové (Suprapur, Merck, Darmstadt, SRN).

Ke kalibraci chromatografické kolony byly použity standardy: thyroglobulin (669 kDa), apoferritin (443 kDa), alkoholdehydrogenasa (150 kDa), albumin (66 kDa), vitamin B12 (1,36 kDa) a jodičnan (0,175 kDa). Pro stanovení mrtvého objemu kolony byl použit komplex modrého dextranu (2000 kDa) s albuminem (všechny standardy Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN). Pro experimenty byly kromě zmíněných standardů použity také 3,3',5-trijod-L-thyroxin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), L-thyroxin (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN), jodid draselný (základní roztok: 1000 ± 2 mg l⁻¹, Analytika Praha, spol. s r.o., Praha, ČR) a jodičnan draselný (GR ACS, Merck, Darmstadt, SRN). Roztoky vnitřních standardů byly připraveny ze základního roztoku 1000 ± 2 mg Ge l⁻¹ (Certipur, Merck, Darmstadt, SRN). Při stanovení celkového množství jodu byl přidáván ke vzorku roztok 25% hydroxidu tetramethylamonia (TMAH) (Sigma-Aldrich, Steinheim, SRN). Pro přípravu všech roztoků v této práci byla použita demineralizovaná voda (Milli-Q, Millipore, Bedford, USA).

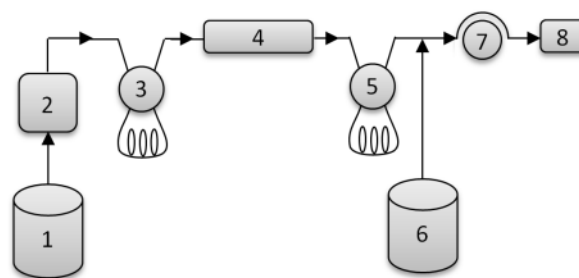
Příprava vzorků

Vzorky tkání pro speciální analýzu byly zakoupeny v běžné obchodní síti. Extrakty byly připraveny mixová-

ním vzorku tkáně (navážka 0,5–1 g) se 2 ml demineralizované vody dispergátorem UltraTurrax při 20 500 otáčkách za minutu po dobu 1 min. Rozmixovaný vzorek byl odstředěn po dobu 20 min při 10 000 otáčkách za minutu. Roztok nad pevným podílem byl převeden do 10ml odměrné baňky. K pevnému podílu byl opět odpipetován 1 ml demineralizované vody a směs byla znovu odstředěna po dobu 20 min. Roztok nad pevným podílem byl přidán do stejné 10ml odměrné baňky a baňka byla doplněna demineralizovanou vodou po rysku. Před nástřikem do kolony byl roztok extraktu vzorku přefiltrován přes nylonový filtr (0,45 μm, Whatman, Buckinghamshire, UK).

V přefiltrovaném extraktu byl stanoven také celkový obsah jodu a to tak, že 5 ml filtrovaného extraktu bylo převedeno do 10ml odměrné baňky, bylo přidáno 0,2 ml 25% TMAH a 0,2 ml roztoku vnitřního standardu Ge o koncentraci 5 mg l⁻¹. Baňka byla doplněna po rysku demineralizovanou vodou.

Pevné vzorky (navážka 0,5–1 g) pro stanovení celkového obsahu jodu byly rozkládány po dobu 10 min



Obr. 1. Schéma chromatografické sestavy: 1 – zásobník mobilní fáze, 2 – vysokotlaké čerpadlo, 3 – dávkovací ventil se smyčkou pro nástřik vzorku, 4 – chromatografická kolona, 5 – dávkovací ventil se smyčkou pro postkolonový nástřik standardů, 6 – zásobník roztoku vnitřního standardu, 7 – peristaltické čerpadlo, 8 – přístroj ICP-MS

Tabulka I

Parametry nastavení ICP-MS pro stanovení celkového obsahu jodu a pro speciální analýzu

Parametr	Celkový obsah jodu	Vylučovací chromatografie
Příkon do plazmatu		1100 W
Průtok Ar zmlžovačem		0,76 l min ⁻¹
Průtok pomocného Ar		1 l min ⁻¹
Průtok plazmového Ar		11 l min ⁻¹
Režim měření		odečet na vrcholu píku
Měřené isotopy		¹²⁷ I, ⁷² Ge
Doba měření jednoho isotopu		50 ms
Počet měření na odečet	10	20
Počet odečtu na opakování	1	1800
Počet opakování	10	1

v mikrovlnném rozkladném zařízení s 3 ml 25% roztoku TMAH, poté byl digerát převeden do 25ml odměrné baňky a baňka byla doplněna po rysku demineralizovanou vodou. Přípravený roztok byl přefiltrován přes nylonový filtr, 9 ml přefiltrovaného roztoku bylo odpipetováno do 10ml odměrné baňky a bylo přidáno 0,2 ml roztoku vnitřního standardu Ge o koncentraci 5 mg l⁻¹.

Metodika měření

Schéma aparatury pro speciální analýzu spojením HPLC a ICP-MS je uvedeno na obr. 1. Dávkovací smyčka umístěná před kolonou sloužila k nástřiku vzorků, kalibrační smyčka umístěná za kolonou sloužila k nástřiku kalibračního roztoku. Tím byl v případě analyzovaných vzorků tkání roztok jodidu o koncentraci 10 µg l⁻¹, v případě testování chromatografické výtěžnosti různých specií jodu jako kalibrační roztoky sloužily roztoky daných specií. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml min⁻¹. Efluent z chromatografické kolony byl pak za použití T-spojky smíchán s roztokem vnitřního standardu Ge (průtok 0,8 ml min⁻¹) o koncentraci 150 µg l⁻¹ a následně analyzován pomocí ICP-MS. Sledovanými isotopy byly ¹²⁷I jako analyt a ⁷²Ge jako vnitřní standard.

V případě stanovení celkového obsahu jodu ve vzorcích po mikrovlnném rozkladu nebo v extraktech pevných vzorků byl kalibrační roztok obsahující 10 µg l⁻¹ I připraven z roztoku jodičnanu. Kalibrační roztok a slepý roztok obsahovaly vnitřní standard Ge o koncentraci 100 µg Ge dm⁻³ a byly stabilizovány roztokem 25% TMAH. Podmínky měření ICP-MS jsou shrnuty v tab. I.

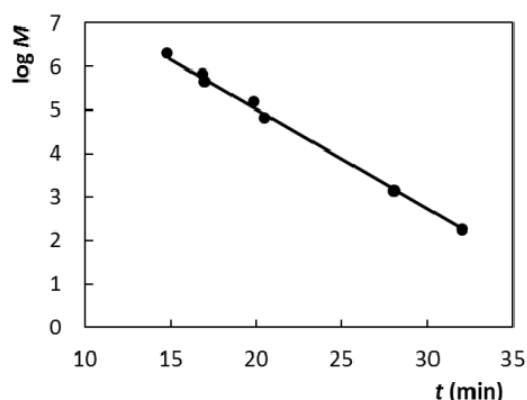
Výsledky a diskuse

Optimalizace složení mobilní fáze

Cílem optimalizace bylo najít vhodné složení mobilní fáze pro dosažení dostatečné separace specií jodu a současně co nejkratšího času analýzy. Výchozí složení mobilní fáze 20 mmol l⁻¹ Tris-HCl o pH 7,5 bylo převzato ze

studie zabývající se frakcionací stopových prvků v mouce¹³. Kalibrační kolony sadou látek o různé molekulové hmotnosti (obr. 2) byl nalezen vztah mezi molekulovou hmotností M a retenčním časem t : $\log M = -0,2287t + 9,5895$. Podle tohoto vztahu by měl být jodid eluován v retenčním čase okolo 33 min. Jeho skutečný retenční čas byl však 56 min. Podobné anomálie vykazaly L-thyroxin a 3,3',5'-trijod-L-thyronin. Znamená to, že tyto látky nejsou separovány pouze na základě hydrodynamického objemu molekul, ale také na základě nespecifických interakcí se stacionární fází, které vedou k prodloužení retenčního času.

Výše uvedenou skutečnost lze přičíst velmi nízké iontové síle (16 mmol l⁻¹) použitého pufru, při které mohou látky interagovat se stacionární fází elektrostatickými interakcemi. Tyto interakce analytů se stacionární fází kolony Superdex 75 byly pozorovány i pro různé specie kovů v již dříve publikovaných pracích^{14,15}. Iontovou sílu pufru Tris-HCl však není možné dále zvyšovat zvýšením jeho koncentrace, a to z důvodů vysokého obsahu rozpuštěných látek (20 mmol l⁻¹ Tris odpovídá 2,4 g l⁻¹), které mohou způsobovat problémy při měření metodou ICP-MS. Iontová síla pufru byla proto zvýšena na 28 mmol l⁻¹ přidáním chloridu sodného (10 mmol l⁻¹ Tris-HCl



Obr. 2. Závislost logaritmu molekulových hmotností ($\log M$) standardů na jejich retenčním čase t pro kolonu Superdex 75 GL

Tabulka II

Retenční časy specií jodu při použití různých mobilních fází

Specie jodu	t_R [min] mobilní fáze A ^a	t_R [min] mobilní fáze B ^b	t_R [min] mobilní fáze C ^c
Thyroglobulin	16,9	17,5	16,6
Albumin	20,5	22,0	18,5
Jodičnan	32,1	33,4	30,0
3,3',5'-Trijod-L-thyronin	38,4	38,2	35,6
Jodid	56,2	69,7	55,7

^a mobilní fáze A: 20 mmol l⁻¹ Tris-HCl; pH 7,5, ^b mobilní fáze B: 10 mmol l⁻¹ Tris-HCl s 20 mmol l⁻¹ NaCl; pH 7,5,

^c mobilní fáze C: 10 mmol l⁻¹ Tris-HCl s 0,2% CH₃OH; pH 7,5

s 20 mmol l⁻¹ NaCl, pH 7,5), a to při zachování stejného obsahu rozpuštěných látek (2,4 g l⁻¹). Bylo zjištěno, že v případě pufru Tris-HCl s přídatkem chloridu sodného sice došlo k dobré separaci specií jodu, ale současně došlo k prodloužení retenčního času jodidu o 13,5 min oproti 20 mmol l⁻¹ Tris-HCl (tab. II). Retenční čas 3,3',5-trijod-L-thyroninu nebyl ovlivněn, což znamená, že není elektrostatickými interakcemi zadržován, ale pravděpodobně je zadržován interakcemi hydrofobními (3,3',5-trijod-L-thyronin má logaritmus distribuční konstanty pro soustavu oktanol/voda při pH 7,5 roven 2,60). Pro potlačení tohoto typu interakcí byla testována mobilní fáze obsahující 10 mmol l⁻¹ Tris-HCl s přídatkem 0,2% methanolu jako organického modifikátoru o pH 7,5. Jejím použitím došlo sice ke zkrácení retenčního času 3,3',5-trijod-L-thyroninu téměř o 3 min (tab. II), došlo však také ke zhoršení separace thyroglobulinu a albuminu. Retenční čas jodidu nebyl přídatkem methanolu ovlivněn. Pro analýzy reálných vzorků byla proto použita výchozí mobilní fáze 20 mmol l⁻¹ Tris-HCl o pH 7,5, u které bylo dosaženo vhodného kompromisu mezi délkou analýzy a separací jednotlivých specií.

Kvantifikace specií jodu

Výše popsané interakce mohou způsobovat kromě prodloužení retenčního času také částečné nebo úplné zachycení některých specií jodu na stacionární fázi, případně se mohou některé specie za podmínek chromatografické separace stát nestabilními. Výtěžnost specií po separaci potom není 100%. Právě výtěžnost je přitom klíčová pro správné využití postkolonové kalibrace, která představuje významnou úsporu času. Bylo zjištěno, že z testovaných specií pouze jodid a jodičnan nejsou na stacionární fázi zachycovány, a lze tak u nich využít postkolonové kalibrace. U ostatních specií dochází k částečnému zachycení (tab. III, hodnoty chromatografických výtěžností v této tabulce byly stanoveny jako poměr signálů specie při nástřiku do kolony a při nástřiku za kolonou) a je nutno buď kalibrovat nástřikem standardů do kolony, nebo provést matematickou korekci intenzity signálu u postkolonového nástřiku. V případě L-thyroxinu a 3,3',5-trijod-L-thyroninu dochází k zachycení značné části jejich dávkovaného množství, které však silně závisí na prostředí, ve kterém je specie rozpuštěna. Zjištěný podíl nezachyceného 3,3',5-trijod-L-thyroninu z amoniakálního roztoku dosahoval přibližně 10 % (tab. III), což odpovídá práci¹⁶, ve které bylo pro tuto látku dosaženo podobné hodnoty výtěžnosti.

Zachycení L-thyroxinu a 3,3',5-trijod-L-thyroninu na stacionární fázi s sebou nese kromě obtížné kvantifikace další vážný problém, a to paměťové efekty kolony. Ukázalo se, že uvedené specie zachycené v koloně jsou při měření reálných vzorků živočišných tkání ze stacionární fáze následně uvolňovány některými středně- až vysokomolekulárními proteiny, na něž se váží, a ve kterých pak není měřen skutečný obsah jodu, ale obsah mnohonásobně vyšší. Uvedená situace je ilustrována na obr. 3. Uvolňování hormonů štítné žlázy ze znečištěné stacionární fáze bylo potvrzeno analýzou roztoků albuminu na několika koncen-

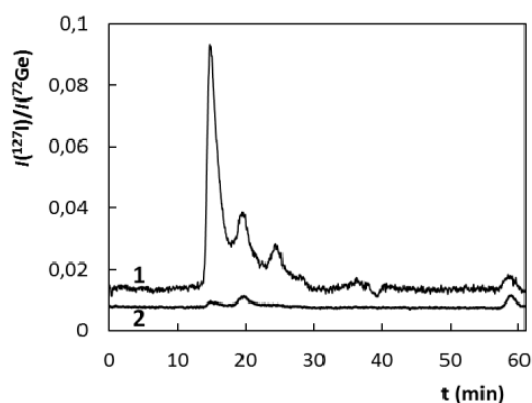
Tabulka III

Výtěžnost specií jodu ve vodném roztoku (*v roztoku 0,14 mol l⁻¹ NH₃) po chromatografické separaci, kalibrace postkolonovým nástřikem standardu jodidu

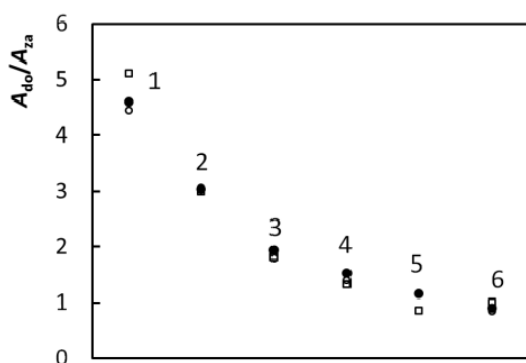
Specie jodu	Výtěžnost chromatografické separace [%]
Jodid	100
Jodičnan	100
Thyroglobulin	87
Albumin	91
3,3',5-Trijod-L-thyronin	0,2 (9*)
L-Thyroxin	1 (10*)

tračních úrovních (300, 600 a 1200 mg l⁻¹ albuminu) a porovnáním plochy piků při dávkování roztoků do kolony a za kolonou (obr. 4). Je zřejmé, že v případě stanovení albuminu na koloně kontaminované hormony štítné žlázy je plocha piků jodu při dávkování na kolonu až 5,1× vyšší, než při dávkování stejných roztoků za kolonou. K vyčištění stacionární fáze od zachycených specií byl použit, vzhledem k nízké rozpustnosti hormonů štítné žlázy v neutrálním prostředí, 0,2 mol l⁻¹ hydroxid sodný. Kolona byla roztokem promývána po dobu 80 minut (průtok 0,4 ml min⁻¹). Uvedený postup vedl k poměrně rychlému vymývání zachycených specií, k dosažení úplného vymytí však bylo potřeba postup zopakovat šestkrát (obr. 4, znázorněny pouze první čtyři cykly vymývání).

Pro jednotlivé specie byla opakovaným měřením ($n=5$) jejich roztoku o koncentraci odpovídající 0,1 μg l⁻¹ stanovena mez detekce a mez stanovitelnosti jako průměr naměřené koncentrace plus trojnásobek resp. desetinásobek směrodatné odchylky (tab. IV). Meze detekce i meze stanovitelnosti se významně neliší pro jednotlivé specie a pohybují se v rozsahu 0,20–0,30 μg l⁻¹ resp. 0,41 až 0,56 μg l⁻¹. Uvedené meze jsou zcela postačující



Obr. 3. Chromatogram extraktu krůtích jater: 1 – před čištěním kolony, 2 – po čištění kolony



Obr. 4. Poměr plochy píku jodu v albuminu při nástřiku roztoku albuminu (□ 300, ○ 600 a ● 1200 mg/l) do kolony A_{10} a za kolonou A_{2a} : 1 – nečištěná kontaminovaná kolona, 2 – po 1. čištění 0,2 mol l^{-1} NaOH, 3 – po 2. čištění, 4 – po 3. čištění, 5 – po 4. čištění, 6 – čistá kolona

pro analýzy většiny vzorků živočišných tkání, a to i po přepočtu na množství dané specie. Jestliže obsah jodu ve standardu albuminu byl stanoven na $1,34 \pm 0,23 \mu\text{g g}^{-1}$, pak mez detekce $0,24 \mu\text{g l}^{-1}$ odpovídá koncentraci albuminu 177 mg l^{-1} a mez stanovitelnosti $0,50 \mu\text{g l}^{-1}$ odpovídá koncentraci 369 mg l^{-1} . Mnohem vyšší obsah jodu byl nalezen ve standardu thyroglobulinu, a to $4,95 \pm 0,60 \text{ mg g}^{-1}$. Mez detekce $0,20 \mu\text{g l}^{-1}$ tak odpovídá koncentraci thyroglobulinu $40 \mu\text{g l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti $0,41 \mu\text{g l}^{-1}$ odpovídá koncentraci $83 \mu\text{g l}^{-1}$. Mez detekce pro L-thyroxin a 3,3',5-trijod-L-thyronin nebyla stanovována vzhledem k jejich vysoké sorpci na stacionární fázi.

Analýza reálných vzorků

Pomocí výše popsané metodiky byly analyzovány reálné vzorky živočišných tkání hospodářských zvířat. Na základě retenčních časů standardů byly identifikovány některé z nalezených specií, konkrétně jodid, albumin a thyroglobulin. Lze však důvodně předpokládat, že ve vzorcích může být přítomen také vazebný protein pro thyroxin (54 kDa) a transthyretin (55 kDa), které jsou společně s albuminem hlavními transportními proteiny pro hormony štítné žlázy¹⁷. Vzhledem k jejich podobné hmotnosti s albuminem je však nelze použitou separační technikou vzájemně rozlišit a jednoznačně tak potvrdit jejich přítomnost. Dále byly nalezeny frakce s vysokou molekulovou hmotností (> 100 kDa: $t_R=14,8$ min; 15,3 min; 16,5 min a 19,8 min) a se střední molekulovou hmotností (31 kDa: $t_R=22,3$ min; 9 kDa: $t_R=24,6$ min). Kromě nich pak byla ve vzorcích nalezena ještě řada specií ($t_R=28,3$ min; $t_R=33,3$ min; $t_R=35,2$ min; $t_R=39,5$ min a $t_R=42,8$ min), u nichž kvůli nespécifickým interakcím se stacionární fází nelze stanovit molekulovou hmotnost. Struktura těchto specií je pravděpodobně, díky podobnému retenčnímu času jako má 3,3',5-trijod-L-thyronin, odvozena od struktury hormonů štítné žlázy. Ukázkový chromatogram viz obr. 5.

Tabulka IV

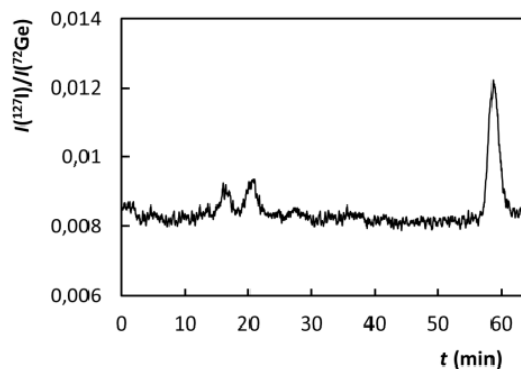
Mez detekce a mez stanovitelnosti pro jednotlivé specie jodu

Specie jodu	Mez detekce [$\mu\text{g l}^{-1}$]	Mez stanovitelnosti [$\mu\text{g l}^{-1}$]
Jodid	0,30	0,56
Jodičnan	0,28	0,54
Thyroglobulin	0,20	0,41
Albumin	0,24	0,50

Celkový obsah jodu stanovený v jednotlivých tkáních a jejich extraktech je uveden v tab. V. Současně je uveden obsah jodu stanovený na základě chromatografické analýzy, při níž byla použita postkolonová kalibrace roztokem jodidu. Z tabulky je patrné, že výtěžnost obsahu jodu po chromatografické separaci vypočtená dle rovnice (1) je pro řadu vzorků nižší než 100 %. To může být způsobeno jak částečnou sorpcí těchto specií na stacionární fázi, tak možnou nestabilitou některých specií během separace. Při rozpadu komplexů proteinů s L-thyroxinem nebo 3,3',5-trijod-L-thyroninem by byly uvolněné hormony zachyceny na stacionární fázi a v důsledku toho by byl naměřen obsah jodu nižší než je skutečný.

Závěr

Analýzou standardů specií jodu vylučovací chromatografií bylo zjištěno, že u řady z nich dochází k silným nespécifickým interakcím se stacionární fází. Tyto efekty se nepodařilo potlačit ani změnou iontové síly použitého pufru. Uvedené interakce mají významný vliv na výtěžnost chromatografické analýzy, se kterým je nutno počítat při volbě nejjvhodnější kalibrační techniky pro danou specii. Výtěžnost jodu po chromatografické separaci byla nižší než 100 % i u většiny vzorků živočišných tkání. Současně bylo ukázáno, že specie jodu zachycené na stacionární fázi mohou být opět uvolněny středně- a vysokomolekulárními proteiny, ve kterých je pak měřený obsah jodu vyšší než



Obr. 5. Chromatogram extraktu kuřecího žaludku

Tabulka V

Celkový obsah jodu v živočišných tkáních a podíl specií prošlých kolonou. Založeno na dvou nezávislých měření každého typu vzorku, uvedena rozšířená nejistota

Vzorek	Celkový obsah jodu [ng g ⁻¹]	Obsah jodu v extraktu [ng g ⁻¹]	Obsah jodu vypočtený z chromatogramu [ng g ⁻¹]	Podíl prošlý kolonou [%] ^a
Hovězí maso	86±12	31,8±3,2	28,8±8,4	90,2±9,1
Kuřecí maso	29±13	22,3±1,3	22,7±1,1	101,7±4,5
Žraločí maso	50,6±4,7	23,3±1,0	22,6±1,2	96,7±5,1
Kuřecí srdce	25,4±2,1	21,5±1,1	19,8±1,5	92,5±4,8
Vepřové ledviny	103±11	62,0±2,6	56,2±4,3	90,6±5,8
Kuřecí žaludek	123±16	49,4±2,4	46,8±4,3	94,9±6,6
Krůtí játra	105,5±7,3	63,6±4,6	56,5±3,1	88,9±4,1
Vepřové maso	34±13	21,2±1,9	20,4±1,3	96,4±5,7
Vepřová štítná žláza	513±160	517±143	336±21	65,9±15,2

^a Podíl obsahu jodu vypočteného z chromatogramu a obsahu jodu v extraktu

skutečný. Před analýzou reálných vzorků je tak nutné důkladně odstranit kontaminace speciemi jodu z kolony.

Tato práce vznikla za podpory projektu GAČR 13-04580S a MŠMT č.20/2014 (AI_FCHI_2014_003).

LITERATURA

- Vogiatzis C. G., Zachariadis G. A.: *Anal. Chim. Acta* 819, 1 (2014).
- Bettmer J., Montes-Bayón M., Ruiz-Encinar J., Fernández-Sánchez M. L., Fernández de la Campa M. R., Sanz-Medel A.: *J. Proteomics* 72, 989 (2009).
- Ciavardelli D., Sacchetta P., Federici G., Di Ilio C., Urbani A.: *Talanta* 80, 1513 (2010).
- Dressler V. L., Goldschmidt Antes F., Marques Moreira C., Pozebon D., Duarte F. A.: *Int. J. Mass Spectrom.* 307, 149 (2011).
- García-Sevillano M. A., González-Fernández M., Jara-Biedma R., García-Barrera T., López-Barea J., Pueyo C., Gómez-Ariza J. L.: *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 1967 (2012).
- Carter J., Ebdon L., Evans E. H.: *Microchem. J.* 76, 35 (2004).
- Koellensperger G., Groeger M., Zinkl D., Petzelbauer P., Hann S.: *J. Anal. At. Spectrom.* 24, 97 (2009).
- Kaňa A., Koplík R., Eichler Š., Mestek O.: *Anal. Lett.* 46, 2430 (2013).
- Chan G. C.-Y., Hieftje G. M.: *Spectrochim. Acta, Part B* 61, 642 (2006).
- Zinn N., Krüger R., Leonhard P., Bettmer J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 537 (2008).
- Sanz-Medel A., Montes-Bayón M., Bettmer J., Fernández-Sánchez M. L., Ruiz-Encinar J.: *Trends Anal. Chem.* 40, 52 (2012).
- Tholey A., Schaumlöffel D.: *Trends Anal. Chem.* 29, 399 (2010).
- Mestek O., Polák J., Koplík R., Komínková J., Šantrůček J., Kůdický M., Kvasnička F.: *Eur. Food Res. Technol.* 225, 895 (2007).
- Koplík R., Pavelková H., Cincibuchová J., Mestek O., Kvasnička F., Suchánek M.: *J. Chromatogr. B* 770, 261 (2002).
- Koplík R., Borková M., Bicanová B., Polák J., Mestek O., Komínková J.: *Food Chem.* 99, 158 (2006).
- Fernandez-Sanchez L., Szpunar J.: *J. Anal. At. Spectrom.* 14, 1697 (1999).
- Dudek W. R.: *High-yield physiology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2008.

L. Hrubá, A. Kaňa, and O. Mestek (*Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Quantitative Analysis of Iodine Species in Biological Samples using Size Exclusion Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry**

The effect of nonspecific sorption of biomolecules in chromatographic columns and that of variable I contents in high-molecular-weight species on the determination of I species is illustrated by speciation analysis of animal tissues. I species were separated by SEC under the optimized conditions. The recoveries of the separations, limits of detection and limits of quantification were estimated.