

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2025

Bc. Pavlína Štefanská

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Elektrochemické stanovení citrulin
Diplomová práce

2025

Bc. Pavlína Štefanská

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Pavlína Štefanská
Osobní číslo:	C23270
Studijní program:	N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin
Téma práce:	Elektrochemické stanovení citrulinu
Téma práce anglicky:	Electrochemical determination of citrulline
Zadávací katedra:	Katedra analytické chemie

Zásady pro vypracování

1. V teoretické části zpracujte rešerši týkající se problematiky výskytu a biologické aktivity aminokyseliny L-citrulin. Zpracujte rovněž přehled metod sloužících ke stanovení L-citrulinu s důrazem na elektroanalytické metody.
2. V experimentální části proveďte optimalizaci stanovení L-citrulinu pomocí voltametrických technik na elektrodách uhlíkového typu.
3. Dosažené výsledky diskutujte a na závěr kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Tomáš Mikysek, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Elektrochemické stanovení citrulinu jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9. května 2025

Bc. Pavlína Štefanská v. r.

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce, panu Ing. Tomáši Mikyskovi, Ph.D., za jeho odborné vedení, cenné rady a pomoc při experimentálním měření a během celé práce.

Poděkování patří také mé rodině, která mě po celou dobu studia velmi podporovala.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zaměřuje na stanovení L-citrulinu elektrochemickými metodami. Citrulin je aminokyselina, která se užívá ve formě doplňku stravy a zkoumá se jako indikátor střevních nebo nefrotických poruch a pro podporu anabolismu. Optimalizace stanovení L-citrulinu byla provedena pomocí voltametrických technik na elektrodách uhlíkového typu.

KLÍČOVÁ SLOVA

L-citrulin, doplněk stravy, elektrochemické stanovení, elektrody

TITLE

Electrochemical determination of citrulline

ANNOTATION

This thesis focuses on the determination of L-citrulline by electrochemical methods. Citrulline is an amino acid that is taken in food supplement form and is being studied as an indicator of intestinal or nephrotic disorders and to promote anabolism. Optimization of the determination of L-citrulline was performed using voltammetric techniques on carbon-type electrodes.

KEYWORDS

L-citrulline, food supplement, electrochemical determination, electrodes

Obsah

1	Úvod.....	12
2	Teoretická část	13
2.1	Aminokyseliny	13
2.2	Citrulin	14
2.2.1	Výskyt citrulinu	14
2.2.2	Biologická aktivita citrulinu	15
2.2.3	Močovinový cyklus	16
2.3	Doplňěk stravy	18
2.4	Metody stanovení citrulinu	19
2.4.1	Separční metody stanovení citrulinu	19
2.4.2	Ostatní možnosti stanovení citrulinu	20
2.5	Elektrochemické metody stanovení citrulinu	22
3	Experimentální část.....	24
3.1	Chemikálie a materiály	24
3.1.1	Příprava roztoků elektrolytů	24
3.1.2	Příprava standardních roztoků a vzorků	25
3.2	Přístroje	26
3.3	Použité metody.....	28
3.3.1	Diferenční pulzní voltametrie.....	28
3.3.2	Voltametrie s lineární změnou napětí.....	28
3.3.3	Square-wave voltametrie.....	28
3.3.4	Spektrofotometrické stanovení citrulinu ninhydrinem.....	28
3.3.5	Derivatizace citrulinu činidlem OPA-ethanthiolem	29
3.3.6	Derivatizace citrulinu siřičitanem	29
4	Výsledky a diskuse.....	30
4.1	Úvodní elektrochemické experimenty	30
4.2	Volba měřicí techniky a pracovní elektrody	35
4.3	Vliv akumulace mědi	42
4.4	Vliv pH v prostředí Britton-Robinsonova pufru	47
4.5	Metoda stanovení citrulinu pomocí tvorby komplexu s mědí.....	55
4.6	Elektrochemické stanovení citrulinu po derivatizaci s OPA-ethanthiolem.....	59
4.6.1	Možnosti využití siřičitanu v derivatizační směsi	66
4.7	Spektrofotometické stanovení citrulinu	67
5	Závěr	69
	Seznam literatury	70

Seznam ilustrací a tabulek

Obrázek 1 Rozdělení základních aminokyselin podle polaridy postranního řetězce [3]	13
Obrázek 2 Strukturní vzorec L-citrulinu [7]	14
Obrázek 3 Močovinový cyklus [9].....	17
Obrázek 4 Vzorek citrulline malate, pump rainbow a standard citrulinu	25
Obrázek 5 Elektrochemický analyzátor PGSTAT128N (Metrohm-Autolab) [35]	26
Obrázek 6 Třielektrodový systém se solným můstkem	27
Obrázek 7 Roztoky kalibrační řady citrulinu s ninhydrinem	29
Obrázek 8 DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě v prostředí 0,1M NH ₄ OH s přídávky a) 100 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,009mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,029mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,079 mM roztoku citrulinu (černá křivka), e) 0,175mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od -1,6 až 0,0 V, potenciálovém kroku 5 mV a amplitudě 25 mV.....	31
Obrázek 9 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě v prostředí 0,1M KNO ₃	32
Obrázek 10 DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě v prostředí amonného pufru o pH 9,5 s přídávky a) 100 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,009mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,029mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,079 roztoku citrulinu (černá křivka), e) 0,175mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), f) 0,269mM roztoku citrulinu (růžová křivka), g) 0,363mM roztoku citrulinu (tmavě zelená křivka), h) 0,454mM roztoku citrulinu (tmavě modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od -1,2 až 0,05 V, potenciálovém kroku 5 mV a amplitudě 25 mV	33
Obrázek 11 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě v prostředí amonného pufru o pH 9,5.....	34
Obrázek 12 DPV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 s přídávky a) 200 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,892mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 1,64mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), při potenciálovém rozmezí od -0,6 až 0,3 V, potenciálovém kroku 5 mV a amplitudě 25 mV.....	36
Obrázek 13 SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 s přídávky a) 1 ppm roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,892mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 1,64mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 2,14mM roztoku citrulinu (černá křivka), při potenciálovém rozmezí od -0,5 až 0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz.....	37
Obrázek 14 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76.....	38
Obrázek 15 SWV na GCPE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 s přídávky a) 1 ppm roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,892mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 1,64mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 2,14mM roztoku citrulinu (černá křivka), při potenciálovém rozmezí od -0,5 až 0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz.....	39
Obrázek 16 SWV v prostředí octanového pufru o pH 4,76 na CPE s přídávky a) 1 ppm roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,892mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 1,64mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 2,14mM roztoku citrulinu (černá křivka), při potenciálovém rozmezí od -0,5 až 0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz.....	40
Obrázek 17 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV v prostředí octanového pufru o pH 4,76 na CPE	41
Obrázek 18 SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 s přídávky a) 250 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,098mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,194mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,452mM roztoku citrulinu (černá křivka), e) 1,49mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od -0,5 až 0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV, frekvenci 25 Hz a akumulacním kroku 60 s.....	42
Obrázek 19 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v 0,1M octanovém pufru o pH 4,76, při akumulacním kroku 60 s	43

Obrázek 20 SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 s přidavky a) 250 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,098mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,194mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,452mM roztoku citrulinu (černá křivka), e) 1,49mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od -0,5 až 0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV, frekvenci 25 Hz a bez akumulčního kroku.....	44
Obrázek 21 SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 s přidavky a) 250 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,098mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,194mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,452mM roztoku citrulinu (černá křivka), e) 1,49mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od 0,5 až -0,25 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV, frekvenci 25 Hz a bez akumulčního kroku.....	45
Obrázek 22 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76, při potenciálovém rozmezí 0,5 až -0,25 V a bez akumulčního kroku ...	46
Obrázek 23 SWV na GCE v prostředí BRB o pH 7,27 s přidavky a) 500 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,098mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,194mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,452mM roztoku citrulinu (černá křivka), e) 1,49mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od 0,5 až -0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz.....	47
Obrázek 24 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 7,27.....	48
Obrázek 25 SWV na GCE v prostředí BRB o pH 6,32 s přidavky a) 500 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,098mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,194mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,452mM roztoku citrulinu (černá křivka), e) 1,49mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od 0,5 až -0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz.....	49
Obrázek 26 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 6,32.....	50
Obrázek 27 SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63 s přidavky a) 500 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,098mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,194mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,452mM roztoku citrulinu (černá křivka), e) 1,49mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od 0,5 až -0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz.....	51
Obrázek 28 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63.....	52
Obrázek 29 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 3,22.....	53
Obrázek 30 Srovnání naměřených záznamů při SWV v prostředí BRB o pH 7,27, 6,32, 5,63, při potenciálovém rozmezí od 0,5 až -0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz.....	54
Obrázek 31 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63.....	55
Obrázek 32 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu pro modelový vzorek při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63.....	55
Obrázek 33 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu pro vzorek citrulline malate při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63.....	56
Obrázek 34 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu pro vzorek pump při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63.....	57
Obrázek 35 Derivatizační reakce aminokyseliny taurinu s OPA v přítomnosti ethanthiolu (A). Navrhované EC-oxidační dráhy OPA-ethanthiolového derivátu taurinu (B) [37].....	59
Obrázek 36 Graf závislosti proudu na koncentraci ethanthiolu, při měření SWV na GCE v prostředí LiClO ₄ s OPA a citrulinem	60

Obrázek 37 Ukázkový voltamogram při měření SWV na GCE v prostředí LiClO ₄ a OPA-ethanthiolu s s přidavky a) 0,290mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), b) 0,383mM roztoku citrulinu (růžová křivka), c) 0,474mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,563mM roztoku citrulinu (modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od 0,2 až 0,8 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 50 mV a frekvenci 80 Hz.....	61
Obrázek 38 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí LiClO ₄ a OPA-ethanthiolu.....	62
Obrázek 39 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí LiClO ₄ a OPA-ethanthiolu.....	63
Obrázek 40 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu pro modelový vzorek při měření SWV na GCE v prostředí LiClO ₄ a OPA-ethanthiolu.....	64
Obrázek 41 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu pro vzorek citrulline malate (šedá křivka) a pro vzorek pump (oranžová křivka) při měření SWV na GCE v prostředí LiClO ₄ a OPA-ethanthiolu	64
Obrázek 42 Graf závislosti proudu na koncentraci siřičitanu při měření SWV na GCE v prostředí LiClO ₄ s OPA a citrulinem.....	66
Obrázek 43 UV/VIS spektrum citrulinu	67
Obrázek 44 Graf závislosti absorbance na koncentraci citrulinu	67

Tabulka 1 Naměřené hodnoty v modelovém vzorku při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63.....	56
Tabulka 2 Naměřené hodnoty ve vzorku citrulline malate při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63.....	57
Tabulka 3 Naměřené hodnoty ve vzorku pump při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63	58
Tabulka 4 Naměřené hodnoty všech vzorků při derivatizaci OPA-ethanthiolem metodou kalibrační křivky	63
Tabulka 5 Naměřené hodnoty všech vzorků při derivatizaci OPA-ethanthiolem metodou vícenásobného standardního přídatku.....	65
Tabulka 6 Naměřené hodnoty všech vzorků při spektrofotometrickém stanovení metodou kalibrační křivky	68

Seznam použitých zkratk

OCT	ornitinkarbamoyltransferáza
ASS	argininosukcinátsyntetáza
ASL	argininosukcinátlyáza
ATP	adenosintrifosfát
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
Pi	monofosfát
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HPLC-ECD	vysoko účinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
HPLC-FLD	vysoko účinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí
RP-HPLC-UV	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi a ultrafialovou detekcí
NMR	nukleární magnetická rezonance
DPV	diferenční pulsní voltametrie
SWV	square-wave voltametrie
LSV	voltametrie s lineární změnou napětí
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
GCE	skelná uhlíková elektroda
GCPE	skelná uhlíková pastová elektroda
CPE	uhlíková pastová elektroda
BRB	Britton-Robinsonův pufr
OPA	<i>o</i> -ftalaldehyd

1 Úvod

Aminokyseliny jsou základní stavební jednotkou proteinů a nezbytné pro fungování organismu. Hrají klíčovou roli jako prekurzory neurotransmiterů, hormonů a podílejí se na řadě metabolických procesů. Z tohoto důvodu je jejich přítomnost a rovnováha v organismu důležitá pro zdraví a správné fungování organismu.

Vzhledem k důležité roli aminokyselin v lidském těle i výživě je důležité znát nejen jejich biologický význam, ale také mít k dispozici přesné a spolehlivé metody pro jejich stanovení. Analýza aminokyselin nachází uplatnění v různých oblastech jako je biomedicína, klinická diagnostika, potravinářství a kontrola kvality krmiv. Aminokyseliny se stanovují pro zjištění nutričních hodnot potravin nebo druhu surovin, ve výživových doplňcích obohacených o aminokyseliny, charakterizaci bílkovinné frakce nebo konkrétní bílkoviny a zjištění nepřítomnosti aminokyseliny při různých onemocnění, jako je například fenylketonurie.

Stanovení aminokyselin je analyticky náročný proces, který často vyžaduje předúpravu vzorku, jako je například hydrolyza bílkovin, derivatizace nebo separace jednotlivých složek. Mezi nejčastěji používané metody patří chromatografie, hmotnostní spektrometrie a další techniky, které umožňují přesnou kvantifikaci jednotlivých aminokyselin.

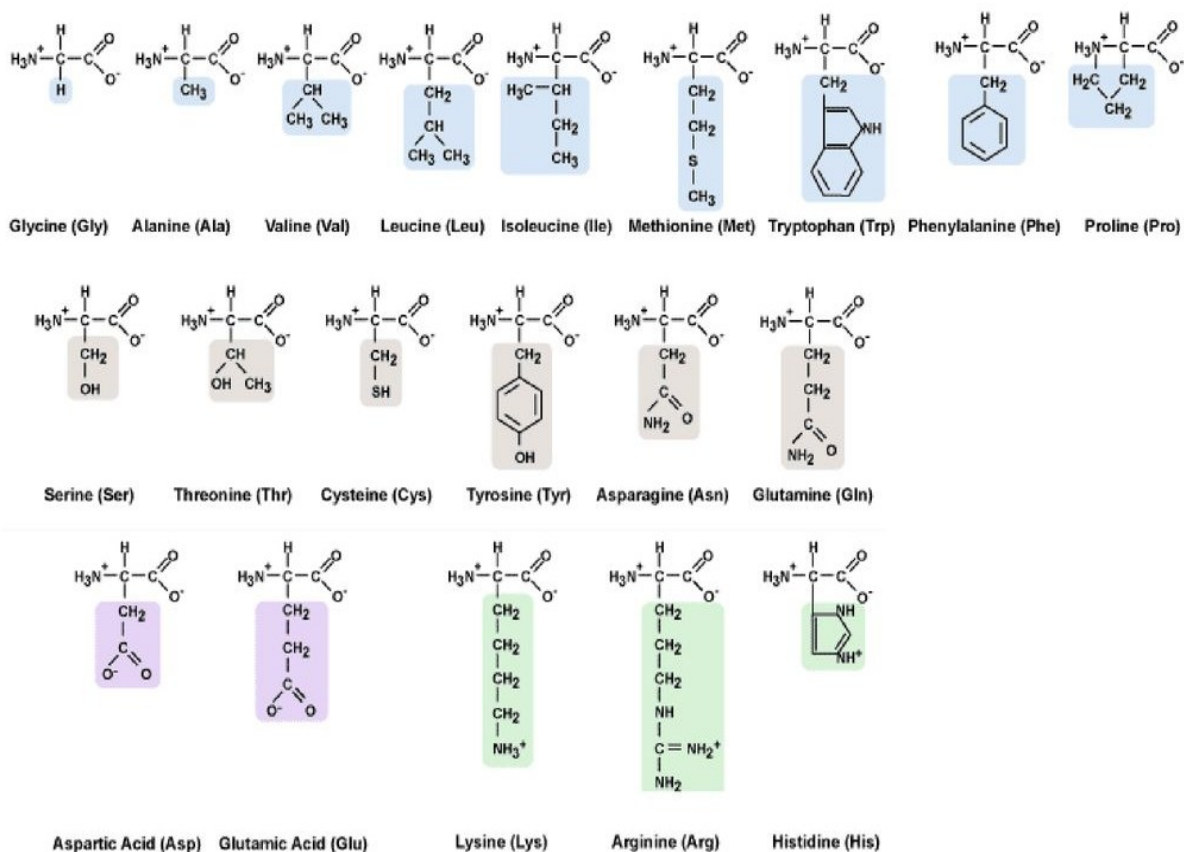
Hlavním cílem této práce je optimalizace stanovení aminokyseliny L-citrulinu pomocí voltametrických technik na elektrodách uhlíkového typu.

2 Teoretická část

2.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou organické sloučeniny, které obsahují aminovou (-NH₂) a karboxylovou (-COOH) funkční skupinu. Tvoří základní složku pro stavbu proteinů. Proteiny se skládají z více než 100 aminokyselin spojených peptidovou vazbou (-CO-NH). Existuje 20 základních aminokyselin. Ty jsou rozděleny podle významu ve výživě pro lidský organismus do 3 kategorií: neesenciální, semiesenciální a esenciální. Mezi neesenciální, které si tělo dokáže generovat samo se řadí alanin, asparagin, kyselina asparagová, kyselina glutamová a serin. Semiesenciální jsou arginin, cystein, glutamin, glycin, prolin, tyrosin. Esenciální, které si tělo nedokáže generovat, musí se přijímat potravou, jsou histidin, leucin, izoleucin, lysin, methionin, fenylalanin, threonin, tryptofan a valin [1].

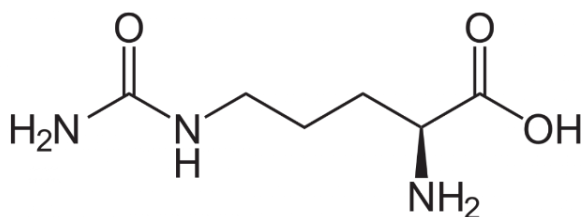
Z 20 základních aminokyselin má každá z nich jiný postranní řetězec a různé fyzikálně-chemické vlastnosti. Z tohoto důvodu jsou rozděleny do dalších 3 kategorií: hydrofobní, hydrofilní a nabité (obr. 1). Hydrofobní aminokyseliny obsahují nepolární postranní řetězec a patří sem fenylalanin, methionin, tryptofan, leucin, izoleucin, valin, prolin, glycin a alanin. Hydrofilní aminokyseliny mají polární postranní řetězec a řadí se sem asparagin, glutamin, cystein, serin, threonin, tyrosin. Nabité aminokyseliny jsou kyselé (záporně nabité) a bazické (kladně nabité). Mezi kyselé aminokyseliny náleží kyselina asparagová a kyselina glutamová. Bazické jsou lysin, histidin a arginin [2].



Obrázek 1 Rozdělení základních aminokyselin podle polarity postranního řetězce [3]

2.2 Citrulin

Citrulin je neesenciální, levotočivá alfa-aminokyselina. Nejčastěji ve formě bílého krystalického prášku. Systematický název je 2-amino-5-(karbamoylamino)pentanová kyselina (obr. 2), sumární vzorec je $C_6H_{13}N_3O_3$, má molekulovou hmotnost 175,19 g/mol a disociační konstantu 2,43 při 25 °C. Zastává důležitou roli jako meziprodukt v močovinovém cyklu, kde se vyrábí z ornitinu a karbamoylfosfátu. Citrulin je neproteinová aminokyselina, nepodílí se na syntéze bílkovin a není aminokyselinou kódovaná DNA, ale nalezneme ho ve vysokých koncentracích ve vodním melounu. Vodní meloun je latinsky *Citrullus lanatus*, odtud byl odvozen i název citrulinu [4].



Obrázek 2 Strukturální vzorec L-citrulinu [7]

2.2.1 Výskyt citrulinu

Citrulin byl poprvé identifikován a izolován společností Koga ze šťávy vodního melounu. Má antioxidační a vazodilatační vlastnosti a účastní se lidského systému oxidu dusnatého. Pro své anaboličké účinky se podává jak podvyživeným a sarkopenickým pacientům, tak ho užívají i profesionální sportovci nebo lidé pro sportovní účely. Cirkulující citrulin je uvolňován z enterocytů, převážně v jejunu a duodenu, kde je syntetizován z prekurzorových aminokyselin odvozených z nutričních proteinů. Vzhledem k tomu, že ledviny jsou hlavním orgánem pro metabolizaci citrulinu na arginin, vysoké hladiny citrulinu v plazmě mohou odrážet selhání ledvin [8].

Citrulin je syntetizován výhradně ve střevě z glutaminu. Je hlavním prekurzorem argininu, takže jeho stanovení slouží jako indikátor o existujících poruchách ve střevě kriticky nemocných pacientů. K přeměně citrulinu na arginin dochází v ledvinách. Nepravidelnosti v metabolismu citrulinu mohou znamenat problémy s ledvinami. Zvýšením produkce oxidu dusnatého se zvyšují koncentrace citrulinu v plazmě a snižuje se riziko plicní hypertenze. U pacientů trpících srpkovitou anémií má citrulin pozitivní vazodilatační a antihypertenzní účinky [6].

Kromě toho se citrulin účastní močovinného cyklu a jeho akumulace nebo nedostatek způsobuje poruchy. Citrulin je schopen stimulovat syntézu bílkovin, aniž by byl vstřebáván střevem nebo játry. Podává se perorálně jako doplněk, neboť střevo jej vstřebává lépe než arginin. Používá se jako alternativa k argininu a ornitinu, protože ty přenášejí vedlejší účinky [6].

Citrulin se také nachází v různých potravinách, včetně mandlí, kaka, česneku, cibule, arašídů, hub a některých ryb, jako je losos. Tyto potraviny mají koncentrace citrulinu, které jsou zanedbatelné ve srovnání s koncentrací obsaženou ve vodním melounu. Koncentrace citrulinu v melounu pěstovaném ve Spojených státech se může pohybovat od 1,6 do 3,5 g/kg čerstvého melounu. K dosažení minimální účinné dávky citrulinu (3 g/den) by bylo třeba zkonsumovat asi 1-1,5 kg/den čerstvého melounu. K dosažení maximální účinné dávky citrulinu (10 g/den) by bylo zapotřebí 3,3-5,0 kg/den čerstvého melounu [5,6].

Vzhledem k významu citrulinu v metabolismu a jeho blahodárným účinkům, ať už formou požití potravou nebo prostřednictvím doplňků, je zajímavé disponovat metodami pro jeho snadné a přesné určení. Citrulin lze stanovit pomocí fluorescenční spektroskopie, vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí nebo elektrochemickými metodami. Většina těchto metod je časově náročná nebo není vhodná pro použití v automatických systémech [6].

2.2.2 Biologická aktivita citrulinu

Citrulin je obvykle doplňován pomocí přípravků obsahujících citrulin. Prodává se konjugovaný s malátem v poměru 2:1 nebo jako extrakt z vodního melounu. Citrulin, stejně jako mnoho dalších doplňků zvyšujících oxid dusnatý, získal velký zájem pro své pozitivní potenciální kardiovaskulární a antihypertenzní schopnosti [5].

Po perorálním požití citrulinu dosahují koncentrace cirkulujícího argininu vrcholu po 1 až 2 hodinách. Vyšší aktivita a biologická dostupnost citrulinu ve srovnání s argininem je způsobena několika faktory, kdy největší význam má životní styl člověka [5].

Glutamin je považován za hlavní prekurzor syntézy střevního citrulinu a jeho suplementace zvyšuje střevní syntézu citrulinu a renálního argininu. Citrulin je tvořen ornitinem v mitochondriích enterocytů i hepatocytů enzymem ornitinkarbamoyltransferázou (OCT), což je jeden ze zásadních enzymů v syntéze citrulinu a v močovinovém cyklu [8].

V hepatocytech je syntetizovaný citrulin oddělen jako meziprodukt močovinového cyklu a nepřispívá k systémovému toku citrulinu. Na rozdíl od toho enterocyty vykazují nízkou produkci dvou enzymů, argininosukcinátsyntetázy (ASS) a argininosukcinátlyázy (ASL), které následně změní citrulin na arginin. Citrulin po syntéze v enterocytech tenkého střeva je uvolňován přes bazolaterální membránu do portálního oběhu. Citrulin je špatně vychytáván hepatocyty, na rozdíl od jiných anabolických androgenních steroidů, a proto obchází jaterní metabolismus [8].

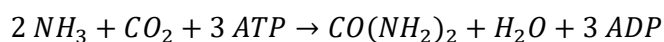
Primárním orgánem syntézy citrulinu jsou ledviny. Po filtraci v glomerulech je většina citrulinu resorbována ledvinovými buňkami proximálních tubulů. Téměř úplná resorpce plazmatických aminokyselin zabraňuje jejich ztrátám moči a pomáhá udržovat homeostázu. Tato metabolická interakce mezi tenkým střevem a ledvinami je známá jako střevně-renální osa a předpokládá se, že zajišťuje dodávku argininu do periferních tkání, které by jinak byly vychytávány játry a indukovaly ureagenezi a tím i katabolismus aminokyselin. Proto je citrulin považován za formu, která má zabránit nadměrnému jaternímu metabolismu anabolických androgenních buněk. Tento mechanismus se aktivuje hlavně v podmínkách s nízkým příjmem bílkovin, například nalačno [8].

U velmi předčasně narozených dětí však může být citrulin přeměněn na arginin přímo střevem *in situ*. Citrulin může sloužit k podpoře proteinového anabolismu ve stavech nízkého příjmu bílkovin. Tímto způsobem citrulin pomáhá omezit pokles plazmatického argininu. Endogenní produkce argininu a citrulinu je zvýšena v případě zánětu se zvýšenou mírou produkce oxidu dusnatého, jako je chronická obstrukční plicní nemoc [8].

Střevně-renální osa je základem procesu zrání, protože ledviny produkují arginin z citrulinu v přítomnosti ASS a ASL, který je diferenciatně vylučován v závislosti na věku. V důsledku toho je plazmatická koncentrace citrulinu u novorozenců nižší ve srovnání s dospělými jedinci a během vývoje se zvyšuje. Pokud jsou ledviny dysfunkční, citrulin je přímo metabolizován na arginin v enterocytech, které vykazují vysokou produkci ASS a ASL, ale nízkou produkci arginázy [8].

2.2.3 Močovinový cyklus

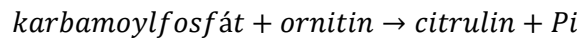
Močovinovým cyklem přeměňuje tělo toxický amoniak na močovinu. Amoniak se produkuje při katabolismu bílkovin nebo přirozeně střevní flórou. Ve svalových a periferních tkáních glutamát přijímá volný amoniak, to vede k tvorbě glutaminu. Glutamin je následně exportován do jater. Glutamináza štěpí glutamin na glutamát a amoniak. Glutamát prostřednictvím enzymu glutamátdehydrogenázy poskytuje močovinu. Amoniak je přeměněn na močovinu v mitochondriích hepatocytů. Močovina odchází z cytoplazmy hepatocytů, poté vstupuje do krevního oběhu, je filtrována ledvinami a vylučována močí. Reakce tvorby močoviny z amoniaku [9,10]:



Rovnice 1

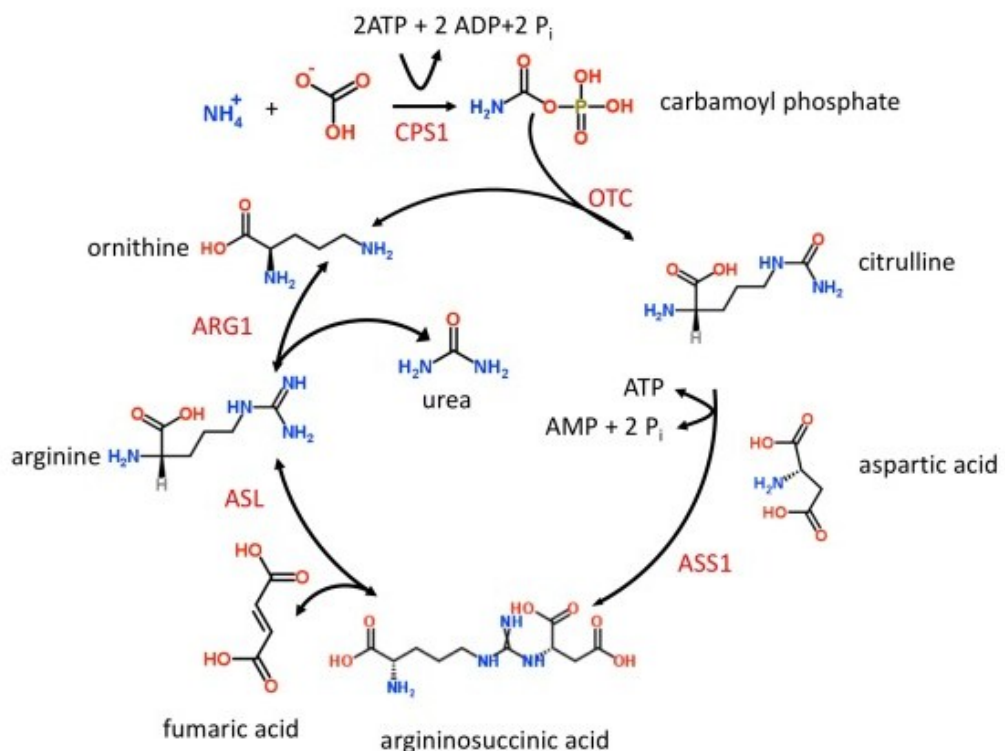
2.2.3.1 Průběh močovinového cyklu

Močovinový cyklus (obr. 3) se skládá z pěti reakcí katalyzovaných několika důležitými enzymy. První dvě reakce probíhají v mitochondriích a zbylé tři v cytosolu hepatocytů. V první reakci je amoniak produkovaný v mitochondriích přeměněn enzymem karbamoylfosfátsyntetázou na karbamoylfosfát. V druhé reakci dochází k přenosu karbamoylové skupiny z karbamoylfosfátu na ornitin enzymem OCT, což vede ke vzniku citrulinu. Následně se citrulin uvolňuje do cytosolu. Reakce tvorby citrulinu z karbamoylfosfátu [10]:



Rovnice 2

Třetí reakce je katalyzována ASS, která využívá citrulin a ATP k vytvoření meziprojektu citrullyl-AMP, který reaguje s aminoskupinou z aspartátu za vzniku argininosukcinátu. Ve čtvrté reakci je štěpen argininosukcinát za tvorby argininu a fumarátu enzymem ASL. Pátá reakce močovinového cyklu je hydrolyza argininu arginázou za vzniku močoviny a ornithinu.



Obrázek 3 Močovinový cyklus [9]

Hlavní význam močovinového cyklu je vyloučení toxického amoniaku z těla. Z těla zdravého dospělého člověka se každý den odstraní asi 10 až 20 g amoniaku. Dysfunkce močovinového cyklu by znamenala nadměrné množství amoniaku v těle, což může vést k hyperamonémii. Nedostatek jednoho nebo více enzymů katalyzujících reakce v močovinovém cyklu může způsobit jeho poruchy. Poruchy močovinového cyklu mohou u novorozenců způsobit zvracení, kóma a křeče [10].

2.3 Doplněk stravy

Podle zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů je doplněk stravy definován jako „potravina, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu a která je koncentrovaným zdrojem vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravine samostatně nebo v kombinaci, určená k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích“. Bezpečnost, výroba a složení jsou přísně regulovány souborem právních předpisů, jak na úrovni Evropské unie, tak i vnitrostátní [12,13].

Doplňky stravy nejsou léčivé přípravky. Jejich použití není určeno k léčbě nemocí. Lze je ovšem využít k prevenci vzniku neinfekčních onemocnění, které vznikají v důsledku nevhodného životního stylu jako jsou špatné stravovací a pohybové zvyklosti. Sportovci je nejčastěji užívají hlavně pro podporu růstu svalové hmoty a její regeneraci nebo pro redukci tělesné hmotnosti, také jako zdroj energie nebo podporu pro vytrvalost. Zbytek populace je užívá převážně pro prevenci proti vzniku zdravotních onemocnění. Jsou dostupně ve formě tablet, prášku, gelu nebo extraktu. Mohou to být minerální látky, vitaminy, vláknina, antioxidanty, esenciální mastné kyseliny, rostliny, bylinné extrakty nebo aminokyseliny [14,15].

Citrulin jako doplněk stravy užívají hlavně sportovci. Pro sportovce má velmi příznivé účinky. Hraje důležitou roli v metabolismu dusíku a oxidu dusnatého v těle. Zvyšuje výkonnost a zároveň snižuje únavu, zlepšuje vytrvalost a prokrvení a je dobré ho užívat u sportů, kde je velká intenzita cvičení. Neužívají ho jen sportovci, ale i ostatní lidé. Pomáhá preventivně proti erektilní dysfunkci, podporuje kardiovaskulární systém, imunitní systém a močovinový cyklus, kde se účastní přeměny amoniaku na močovinu a tím umožňuje bezpečně vyloučit amoniak z těla.

2.4 Metody stanovení citrulinu

Aminokyseliny se mohou stanovit různými technikami. Chromatografickými technikami, jako je papírová a tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se využívá ve spojení se separačními technikami, jako jsou obrácené fáze, iontová výměna nebo chirální separace. Dále se pro stanovení aminokyselin mohou použít i elektromigrační techniky, jako je kapilární elektroforéza nebo kapilární izotachoforéza. K detekci aminokyselin, po jejich separaci, se používá refraktometrická, hmotnostní, chemiluminiscenční, elektrochemická a UV detekce, zde je ale nutná derivatizace.

2.4.1 Separační metody stanovení citrulinu

Zjištění, že citrulin má pozitivní účinky na kardiovaskulární systém a celkově na lidský organismus vedlo k velkému zájmu stanovení jeho množství v přírodní formě, hlavně v melounech a dýních. Pro stanovení citrulinu byly zkoušeny různé druhy separačních metod, například plynová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie i kapilární elektroforéza a různé formy detekce, například MS, FLD a UV. Níže jsou uvedeny odborné publikace, které se zabývaly stanovením citrulinu v potravinách separačními metodami.

Metoda stanovení, od Agnes M. Rimandoa a Penelope M. Perkins-Veazie, využívající plynovou chromatografii a hmotnostní spektrometrii (GC-MS) k oddělení citrulinu od kyseliny glutamové se zaměřila na zjištění jestli se hodnoty citrulinu v melounech liší mezi odrůdami, typy, barvami dužiny a tkáněmi. Obsah citrulinu se pohyboval v rozmezí od 3,9 do 28,5 mg/g sušiny a byl podobný mezi semennými a bezsemennými typy. Melouny s červenou dužinou měly o něco méně citrulinu než melouny se žlutou nebo oranžovou dužinou. Sušina z kůry obsahovala více citrulinu než dužina v čerstvém stavu. Tyto výsledky naznačují, že kůra z melounu, která je nedostatečně využívaný zemědělský odpad, nabízí zdroj přírodního citrulinu [16].

Stanovení pomocí kolony C8 ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii s fluorescenční detekcí (HPLC-FLD), od Karen A. Corleto a kol., uvádí separaci a kvantifikaci 21 aminokyselin včetně citrulinu z čerstvé zeleniny a komerčních šťáv. Optimální separační podmínky pro analýzu aminokyselin byly získány s 20mM octanem sodným a vodou s organickým modifikátorem acetonitrilem a methanolem. Bylo zjištěno, že ideální pH a teplota kolony je 5,4 a 35 °C. Metoda byla úspěšně použita pro kvantifikaci aminokyselin v šesti čerstvých zeleninových šťávách včetně melounu, okurky, celeru, dýně, cuketové dýně, žluté dýně a komerčních šťáv. Obsah citrulinu byl nejvyšší ve sladké melounové šťávě a komerční melounové limetkové šťávě. Optimalizovaná metoda je rychlá, citlivá, přesná a reprodukovatelná pro analýzu volných aminokyselin včetně citrulinu z různých zeleninových šťáv a dalších potravinářských výrobků. Jednalo se o první zprávu o oddělení derivátů OPA aminokyselin pomocí sloupce C8 z melounu, okurky, cuketové dýně, žluté tykve, dýně a celeru v systému HPLC-FLD [17].

Většina současných metod kvantifikace citrulinu a argininu vyžaduje časově náročné chemické derivatizační kroky a často používá dražší detekční metody, jako je fluorescenční detekce. Cílem této studie, od Joel B. Johnson a kol., bylo proto vyvinout jednoduchou a rychlou metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi využívající ultrafialovou detekci (RP-HPLC-UV), aniž by bylo nutné analyt derivatizovat. Metoda byla použita ke kvantifikaci obsahu citrulinu a argininu ve 13 australských ovocných a zeleninových kultivarech. Nejvyšší obsah citrulinu byl zjištěn ve zralém plodu citronového melounu (39,2 mg/g sušiny), které mělo také nejvyšší poměr citrulin:arginin. Dužina červeného melounu také obsahovala vysoké hladiny citrulinu (22,9 mg/g). V ostatních melounech a dýních byly nižší koncentrace (1-3 mg/g). Hladiny argininu byly nejvyšší v dužině červeného melounu (8,1 mg/g). Tato metoda může být vhodná pro screening velkého počtu vzorků na obsah citrulinu a argininu [18].

Při stanovení citrulinu z perorální formulace pro pediatrické použití byla použita jednoduchá a vysoce citlivá kapilární elektroforéza s UV detekcí (CE-UV), která byla navržena L. J. Salvo. Nová metoda byla založena na analýze citrulinu pro přímou detekci ultrafialového záření při 198 nm. BGE se skládal z 10mM tetraboritanu sodného a 50mM SDS při pH 9 a elektroforetické parametry byly optimalizovány. Metoda nabízí vyšší citlivost a specificitu ve srovnání s výsledky získanými z HPLC metody s použitím UV detektorů, ve kterých citrulin je třeba derivatizovat. Nízká cena a jednoduchost systému umožnily rychlé a jednoduché stanovení citrulinu [19].

2.4.2 Ostatní možnosti stanovení citrulinu

Citrulin byl stanoven i spektrální technikou NMR. Vývoj metody pro identifikaci a kvantifikaci aminokyselin a cukrů současně ze vzorků vodního melounu pomocí kvantitativní protonové NMR popisuje studie od G.K. Jayaprakasha a S. Patil Bhimanagouda. Lyofilizované vzorky melounu byly extrahovány oxidem deuteria sonikací a odstředěný extrakt byl přímo použit pro kvantifikaci a identifikaci pomocí ^1H NMR. Hladiny citrulinu a cukrů byly změřeny za méně než 6 minut. Tato metoda rychlé kvantifikace byla ověřena z hlediska specificity, linearity, přesnosti, reprodukovatelnosti a robustnosti [20].

Výše uvedené publikace byly zaměřeny na stanovení citrulinu v potravinách. Byly nalezeny i odborné publikace, kde byl citrulin stanovován v klinických vzorcích [21-25]. Podobných metod je celá řada a liší se jen použitou metodou a detekcí. Z dosud popsanych metod je nejrozšířenější vysokoúčinná kapalinová chromatografie, pro svou dobrou citlivost a využití při screeningu. Nevýhody většiny metod jsou vysoké náklady na přístroje, dlouhá doba čekání na odezvu a náročná derivatizace.

2.4.2.1 Derivatizace

Derivatizace nebo modifikace chemické struktury se často používá s cílem zlepšit detekovatelnost nebo chromatografickou výkonnost cílových analytů. Proces derivatizace je analytický postup, který má za úkol dosažení souladu mezi činidlem a cílovými sloučeninami obsahujícími hydroxyl, thiol, amino, karbonyl nebo karboxyl jako hlavní funkční skupinu zapojenou do derivatizace [26].

Derivatizace může být jednoduchá reakce mezi analytem a činidlem, kdy se provádí substituce nebo kondenzace funkční skupiny pomocí reaktivního derivatizačního činidla. Může jít i o složité cesty, kdy je zapojena více než jedna funkční skupina, v důsledku mnoha po sobě jdoucích reakcí, s eliminací částí malých molekul během procesu a tvorbou nových skupinových vazeb [26].

Derivatizací se na cílovou sloučeninu nebo sloučeniny přivede chemická modifikace, která je vyvolána pomocí chemické reakce a/nebo fyzikálními faktory (tj. ohřevem, ozařováním nebo elektrickým polem). Při výběru derivatizační reakce je třeba nejprve vzít v úvahu účel analýzy a zamýšlenou metodu detekce. Běžné derivatizace mají za cíl zavedení molekuly obsahujících chromofory, fluorofory nebo skupiny pro zvýšení detekovatelnosti. Derivatizační reakce mohou být prováděny ve dvou konfiguracích s ohledem na chromatografickou separaci. Off-line před separací nebo on-line před nebo po separaci [26].

In situ derivatizace je nejjednodušším přístupem pro analýzu. Chemické derivatizace se provádí přidáním činidla nebo činidel přímo do kapalného vzorku. Pokud je činidlo mísitelné s vodou, může být činidlo rozpuštěno ve vodném nebo částečně vodném rozpouštědle nebo v organickém rozpouštědle, které je mísitelné s vodou. V mnoha aplikacích se složitý vzorek nejprve zjednoduší odstraněním částí složek matrice, jako jsou proteiny nebo jiné přírodní druhy, aby se vyčistilo a eliminovalo mnoho interferencí při derivatizaci z matrice vzorku [26].

Aby se zlepšila detekovatelnost nebo separace, byly vyvinuty různé derivatizační metody pro aminové skupiny pomocí běžných derivatizačních činidel, jako je dansylchlorid, o-ftalaldehyd (OPA), 9-fluorenylmethylchlorformiát (FMOC-Cl), Marfeyovo činidlo (dansylchlorid a 1-fluoro-2,4-dinitrofenyl-5-L-alaninamid). Aplikace dvou nejčastěji používaných derivatizačních činidel pro aminoskupinu jsou o-ftalaldehyd s thiolem a fluorenylmethoxykarbonylchlorid (FMOC-Cl) [26,27].

OPA má schopnost tvořit fluorescenční produkt s primárními aminy, takže je užitečný pro detekci a odhad různých biogenních aminů, aminokyselin, peptidů a proteinů. Kombinace thiolu a aminu s OPA navíc vytváří citlivější fluorogenní sloučeninu, která významně zvyšuje citlivost a specifitu analytických technik založených na OPA [28].

2.5 Elektrochemické metody stanovení citrulinu

Elektrochemické metody jsou dobrou volbou stanovení citrulinu díky své jednoduchosti, dobré citlivosti, mobilitě, snadné obsluze a nízké ceně. Níže jsou uvedeny odborné publikace, které se zabývaly stanovením citrulinu kolorimetricky, na elektrochemiluminiscenčních nebo voltametrických senzorech, biosenzorech a citrulinem modifikovaných elektrodách.

Metoda od Sugawary a kol. popisuje přímé kolorimetrické stanovení zbytků citrulinu v proteinech na základě reakce s diacetylmonoximem v přítomnosti nižších koncentrací kyseliny sírové. Snížená citlivost způsobená nižší koncentrací kyseliny byla překonána přidáním chloridu železitého, který také přispěl ke stabilizaci barvy. Nerozpustné proteiny nebo proteiny vedoucí k zákalu lze analyzovat po částečné hydrolyze s enzymem nebo kyselinou. Metoda umožnila stanovit nízké hladiny citrulinu vázaného na protein, které jsou za hranicemi konvenčních metod pomocí analyzátoru aminokyselin. Stanovil se obsah citrulinu v zrohovatělých buňkách epidermis novorozených potkanů a také inhibitor trypsinu ze sóji [29].

Elektrochemická detekce byla poprvé spojena s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve studii od Y. Deng a kol., pro použití současného stanovení argininu a citrulinu v tykvočných plodech a melounech. Pro analýzu argininu a citrulinu bylo použito OPA jako předkolonové derivatizační činidlo. Chromatografické podmínky a parametry byly systémově optimalizovány. Metoda prokázala vysokou citlivost, snadnou obsluhu a dobrou reprodukovatelnost. Arginin a citrulin byly separovány během 9,5 minuty a kvantifikovány, což dává lineární rozsah 0,01-10,00 μM . Tento analytický přístup se zařadil jako nový nástroj pro současné stanovení těchto dvou aminokyselin. Jednalo se o první zprávu o použití systému HPLC-ECD pro analýzu citrulinu a argininu ve vzorcích potravin [30].

Nový biosenzor, od R. Lavanya, na bázi kurkuminu (E)-5-(4-hydroxyfenyl)-1-fenylpent-4-en-1,3-dion (5HPD), který byl úspěšně syntetizován pro selektivní detekci citrulinu. Jobova analýza grafu ukázala stechiometrii vazby 1:1 mezi senzorem a citrulinem. Nově syntetizovaný senzor 5HPD byl vysoce selektivní detekcí vůči citrulinu s různými kompetitivními biomolekulami [31].

V práci od C. Martínez-Asenjo a kol. byl vyvinut elektrochemiluminiscenční senzor pro citlivé stanovení citrulinu, ve kterém byla sloučenina současně jako analyt a koreaktant v kombinaci s nanomateriálem SnS_2 . Použití SnS_2 způsobilo značné zlepšení elektrochemiluminiscenční odezvy, když $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ komplex byl použit jako luminofor. Po optimalizaci parametrů, které ovlivnily elektrochemiluminiscenční odezvu, bylo dosaženo dobré linearitě a rozmezí 10 μM -1 mM citrulinu. Byly provedeny studie stability a trvanlivosti senzoru a byly analyzovány potenciálně interferující sloučeniny. Obsah citrulinu byl stanoven ve vzorku potravin, což potvrdilo stabilitu vyvinutého elektrochemiluminiscenčního senzoru [6].

Citrulin lze využít i pro jiná elektrochemická stanovení, například jako modifikátor povrchu elektrod. Voltametrický senzor od Wanga a kol. byl zkonstruován jednoduchým nakapáváním jedностěnných uhlíkových nanotrubiček (SWCNT) nejprve na elektrodu ze skelného uhlíku (GCE) a následně elektropolymerizací filmu citrulinu. Výsledný poly(l-citrulin)/SWCNTs/GCE vykazoval významnou voltametrickou odezvu na pikrosid II v důsledku synergického účinku SWCNTs a poly(l-citrulinu) filmu. Na základě systematického výzkumu a některých kinetických parametrů vypočtených v experimentech byl spolehlivě získán reakční mechanismus pikrosidu II na poly(l-citrulin)/SWCNT modifikovaném GCE. Nakonec byl navržený senzor použit pro stanovení pikrosidu II v reálném vzorku s uspokojivými výsledky. Tato práce podpořila potenciální aplikace aminokyselinových materiálů a SWCNT v elektrochemických senzorech [32].

Li a kolektiv připravili voltametrický senzor, simultánní elektropolymerizací citrulinu a β -cyklodextrinu filmem modifikované elektrody ze skelného uhlíku. Byl použit ke konstrukci tohoto senzoru pro kvantifikaci důležitých pesticidů a citlivé stanovení metribuzinu. Navrhovaný metribuzinový senzor vykazuje vynikající výkon se širokým lineárním rozsahem, ultranízkým detekčním limitem a příznivou specificitou. Senzor byl také použit pro stanovení metribuzinu v reálných vzorcích, kde bylo dosaženo uspokojivých výsledků. Výsledky naznačují, že navržený senzor může být potenciálně využit pro vědu o znečištění životního prostředí a environmentální analytickou chemii [33].

Ma a kolektiv popisuje modifikaci povrchu elektrody ze skelného uhlíku pomocí citrulinu a cyklické voltametrie za účelem přípravy polycitrulinem modifikované elektrody (PCit/GCE). Elektrochemické chování ractopaminu na tomto PCit/GCE bylo poté zkoumáno cyklickou voltametrií, aby se vytvořila nová elektrochemická metoda pro detekci zbytků ractopaminu v živočišné tkáni. Bylo zjištěno, že optimální podmínky pro přípravu modifikované elektrody zahrnují pH polymeračního roztoku 6,8. Cyklická voltametrie vyžadovala 12 skenovacích cyklů při rychlosti skenování 40 mV/s s potenciálním rozsahem -1,6 až 2,3 V. Optimální podmínky pro stanovení ractopaminu byly v roztoku pH 6,0 s cyklickou voltametrií prováděnou při rychlosti skenování 60 mV/s a potenciálním rozsahu 0,4 až 1,0 V [34].

3 Experimentální část

Experimentální část se zabývá způsobem přípravy reakčních roztoků, vzorků a technikami, které byly použity pro elektrochemické stanovení citrulinu.

3.1 Chemikálie a materiály

Hydroxid sodný	J. T. BAKER
Hydroxid amonný	J. T. BAKER
Dusičnan draselný	LACHEMA
Kyselina chlorovodíková	FLUKA CHEMIKA
Měď	SIGMA ALDRICH
Standard citrulinu	SIGMA ALDRICH
Chloristan lithný	HONEYWELL
Ethanthiol	SIGMA ALDRICH
Methanol	HONEYWELL
OPA	SIGMA ALDRICH
Sířičitan sodný	LACHEMA

3.1.1 Příprava roztoků elektrolytů

Roztoky elektrolytů byly použity 0,1M NaOH, 0,1M NH₄OH, 0,1M KNO₃, 0,1M octanový pufr o pH 4,76, 0,1M amonný pufr o pH 9,5, 0,1M HCl, Britton-Robinsonovy pufrы o pH 7,27, 6,32, 5,63, 4,23 a 3,22 a 0,1M LiClO₄.

0,1M roztok NaOH a 0,1M roztok KNO₃ byly připraveny navážením NaOH a KNO₃ do 100ml odměrných baněk a doplněny destilovanou vodou po rysku. Roztoky 0,1M NH₄OH, 0,1M octanový pufr o pH 4,76, 0,1M amonný pufr o pH 9,5 a 0,1M HCl byly připraveny odpipetováním NH₄OH, octanového pufru, amonného pufru a 32% HCl do 100ml odměrných baněk a doplněny destilovanou vodou po rysku. Britton-Robinsonovy pufrы o pH 7,27, 6,32, 5,63, 4,23 a 3,22 byly připraveny smícháním Britton-Robinsonova pufru (kyselá složka A – 0,04M kyselina octová, kyselina fosforečná a kyselina boritá) a 0,2M NaOH (zásaditá složka B) do výsledné hodnoty pH, které bylo naměřeno pH-metrem.

Roztok elektrolytu LiClO_4 o koncentraci 0,1M pro naplnění solného můstku elektrody byl připraven navážením 0,532 g LiClO_4 do 50ml odměrné baňky a doplněno po rysku. 100 ml roztoku elektrolytu LiClO_4 o koncentraci 0,1 M a 3,7 mmol/l OPA bylo připraveno navážením 1,064 g LiClO_4 a 49,58 mg OPA do 100ml odměrné baňky a doplněno po rysku. Tento roztok elektrolytu se musel uchovávat v lednici při 4 °C. Roztok 71 mmol/l ethanthiolu byl připraven odpipetováním 500 μl 97 % ethanthiolu do 100ml odměrné baňky a doplněno po rysku. U všech těchto roztoků bylo použito rozpouštědlo methanol. Roztok siřičitanu pro derivatizaci byl připraven navážením 0,4473 g Na_2SO_3 do 50ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. U tohoto roztoku bylo použito rozpouštědlo destilovaná voda.

3.1.2 Příprava standardních roztoků a vzorků

Standardní roztok citrulinu o koncentraci 0,01 M byl připraven navážením 17,5 mg standardu citrulinu (obr. 4 – vpravo) do 10ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Standardní roztok mědi o koncentraci 10 ppm byl připraven odpipetování 100 μl standardu mědi o koncentraci 987 ppm do 10ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Vzorek citrulline malate byl připraven navážením 26,25 mg do 10ml odměrné baňky a doplněno po rysku. Vzorek pump byl připraven navážením 26,25 mg do 10ml odměrné baňky a doplněno po rysku. Vzorky citrulline malate a pump byly zakoupeny od firmy Nutrend (obr. 4 – vlevo). Modelový vzorek citrulinu byl připraven navážením 17,5 mg standardu citrulinu do 10ml odměrné baňky a doplněno po rysku. Pro doplnění výše uvedených roztoků byla použita destilovaná voda.



Obrázek 4 Vzorek citrulline malate, pump rainbow a standard citrulinu

3.2 Přístroje

Všechna voltametrická měření byla provedena na elektrochemickém analyzátoru PGSTAT128N (Metrohm-Autolab) (obr. 5). K měření byl použit laboratorní stojan na elektrody, nádobka pro voltametrické měření, magnetická míchačka s míchadlem a přívod inertního plynu.



Obrázek 5 Elektrochemický analyzátor PGSTAT128N (Metrohm-Autolab) [35]

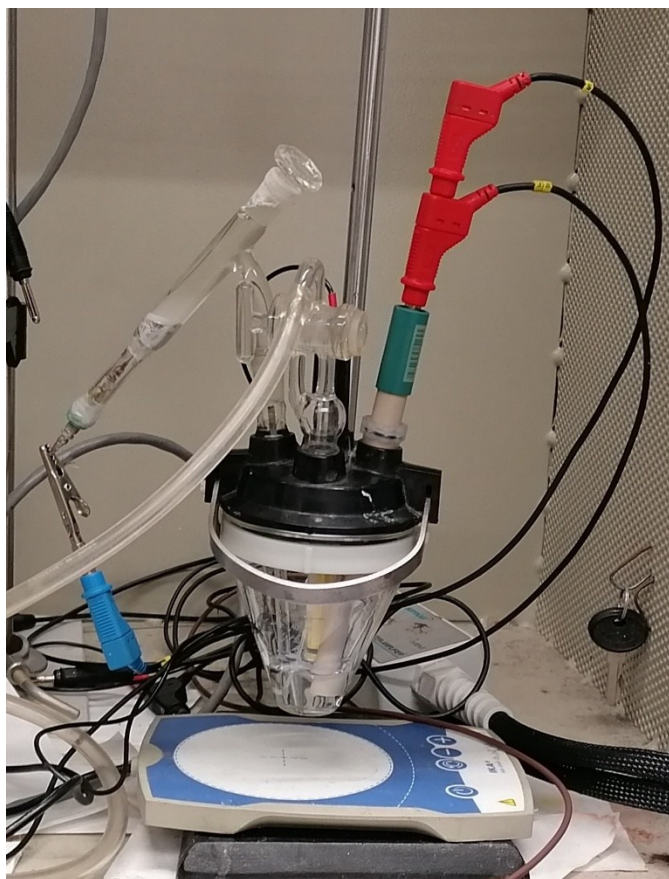
Při všech voltametrických měřeních byly použity indikační elektrody:

- HMDE (visící kapková rtuťová elektroda, z angl. „hanging mercury drop electrode“)
- GCE (elektroda ze skelného uhlíku, z angl. „glassy carbon electrode“)
- GCPE (pastová elektroda ze skelného uhlíku, z angl. „glassy carbon paste electrode“)
- CPE (uhlíková pastová elektroda, z angl. „carbon paste electrode“)
- Au (zlatá elektroda)
- Pt (platinová elektroda)

Referenční elektrody:

- Ag/AgCl 3M KCl
- Nasycená kalomelová elektroda se solným můstkem obsahujícím methanol s 0,1M LiClO₄

Celý tříelektrodový systém (obr. 6) doplňovala pomocná elektroda z platinového plíšku.



Obrázek 6 Třielektrodový systém se solným můstkem

K měření a vyhodnocování záznamů diferenční pulzní voltametrie, voltametrie s lineární změnou napětí a square-wave voltametrie byl použit software „NOVA 1.11.2“. U referenční metody k měření a vyhodnocování záznamů byl použit spektrofotometr se skleněnou kyvetou. Hodnoty pH Britton-Robinsonových pufrů byly změřeny přenosným pH-metrem Orion Star A325 (Thermo Scientific) se skleněnou pH-elektrodou. K pipetování byly použity laboratorní automatické pipety Eppendorf a k navažování laboratorní analytické váhy Santorius.

3.3 Použité metody

3.3.1 Diferenční pulzní voltametrie

Diferenční pulzní voltametrie byla použita s visící kapkovou rtuťovou elektrodou a GCE. Před každým měřením byl z roztoku odstraněn kyslík pomocí přívodu inertního plynu a obnoven povrch elektrody. Potenciálové rozmezí se pohybovalo od -1,6 až 0,5 V, při potenciálovém kroku 5 mV a amplitudě 25 mV (detailnější informace příslušných měření jsou uvedeny v kapitole Výsledky a diskuse).

3.3.2 Voltametrie s lineární změnou napětí

Voltametrie s lineární změnou napětí (LSV, z angl. „linear sweep voltammetry“) byla použita s GCE, GCPE a CPE. Před každým měřením byl z roztoku odstraněn kyslík pomocí přívodu inertního plynu a obnoven povrch elektrody. Potenciálové rozmezí se pohybovalo od -1,5 až 1,5 V, při potenciálovém kroku 2,44 mV a rychlosti skenu 0,1 V/s (detailnější informace příslušných měření jsou uvedeny v kapitole Výsledky a diskuse).

3.3.3 Square-wave voltametrie

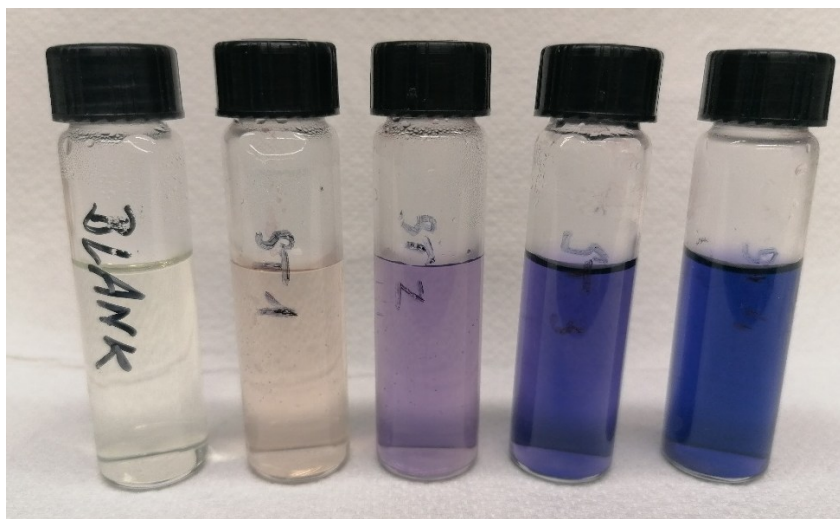
U square-wave voltametrie byla použita GCE, GCPE, CPE, zlatá a platinová elektroda. Před každým měřením byl z roztoku odstraněn kyslík pomocí přívodu inertního plynu a obnoven povrch elektrody. Potenciálové rozmezí se pohybovalo od -0,6 až 1,0 V, při potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz (detailnější informace příslušných měření jsou uvedeny v kapitole Výsledky a diskuse).

3.3.4 Spektrofotometrické stanovení citrulinu ninhydrinem

Spektrofotometrické stanovení citrulinu ninhydrinem bylo využito pro porovnávání s výsledky z voltametrických měření. Bylo připraveno 25 ml zásobního roztoku citrulinu o koncentraci 8 g/l navážením 0,2 g standardu citrulinu do 25ml odměrné baňky a doplněno po rysku destilovanou vodou. Ze zásobního roztoku byly dále připraveny pracovní roztoky citrulinu o koncentracích 1, 2, 3 a 4 g/l do 10ml odměrných baněk. Postupně bylo do čtyř 10ml odměrných baněk odpipetováno 1,25 ml, 2,5 ml, 3,75 ml a 5 ml zásobního roztoku citrulinu a doplněno po rysku destilovanou vodou.

Do čtyř zkumavek bylo postupně z každého pracovního roztoku odpipetováno 0,5 ml a do páté zkumavky 0,5 ml destilované vody jako blanku. Do dalších tří zkumavek bylo pipetováno 0,5 ml z již připravených vzorků citrulline malate, pump a modelového vzorku.

Do všech zkumavek bylo napipetováno po 1 ml připraveného ninhydrinu. Zkumavky byly uzavřeny a 10 minut se s nimi intenzivně třepalo. Poté byly zahřívány 10 minut ve vodní lázni a 10 minut zůstaly odstáté z vodní lázně. Po této úpravě se do každé zkumavky odpipetovaly 4 ml vody, zkumavky se protřepaly a připravené roztoky (obr. 7) byly ihned změřeny na spektrofotometru při 570 nm [36].



Obrázek 7 Roztoky kalibrační řady citrulinu s ninhydrinem

3.3.5 Derivatizace citrulinu činidlem OPA-ethanthiolem

Stanovení citrulinu derivatizací s činidlem OPA-ethanthiol bylo provedeno podle postupu dle nalezeného článku o voltametrickém stanovení taurinu v energetických nápojích po OPA-ethanthiol derivatizaci od A. S. Farag a kolektiv [37].

Bylo měřeno metodou SWV v potenciálovém rozmezí od 0,2 do 1,2 V, při potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 50 mV a frekvenci 80 Hz. 0,1M LiClO₄ v 50ml odměrné baňce byl použit pro naplnění solného můstku přes injekční stříkačku. Můstek byl naplněn do poloviny zábrusu a vložila se srovnávací nasycená kalomelová elektroda. Pracovní elektrody byly zkoušeny GCE, CPE a Pt elektroda. Bylo měřeno za stejných podmínek. Reakční doba byla 6 minut.

3.3.6 Derivatizace citrulinu siřičitanem

Stanovení citrulinu derivatizací se siřičitanem bylo provedeno podle postupu dle nalezených článků o derivatizaci primárních aminů pomocí siřičitanu sodného od W. A. Jacobs [38].

Bylo měřeno metodou SWV v potenciálovém rozmezí od 0,2 do 1,2 V, při potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 50 mV a frekvenci 80 Hz. 0,1M LiClO₄ v 50ml odměrné baňce byl použit pro naplnění solného můstku přes injekční stříkačku. Můstek byl naplněn do poloviny zábrusu a vložila se srovnávací nasycená kalomelová elektroda. Pracovní elektrody byly zkoušeny GCE a CPE. Bylo měřeno za stejných podmínek. Reakční doba byla 4 minuty.

4 Výsledky a diskuse

Voltametrické stanovení citrulinu je ústředním tématem této práce. Vzhledem k tomu, že v literatuře nebyly nalezeny odkazy týkající se voltametrického stanovení této aminokyseliny pomocí tvorby komplexů s kovy, představoval výzkum v této oblasti výzvu. Jako předloha sloužila odborná publikace, která se zabývala stanovením konstant stability měďnatého komplexu glycinu ve směsi vody a alkoholu pomocí potenciometrie [39] a publikace o vztahu mezi strukturou a oscilopolarografickým chováním některých aminokyselin a peptidů [40]. Z dalších možností byla derivatizace činidlem OPA-ethanthiolem nebo siřičitanem a její využitelnost byla testována.

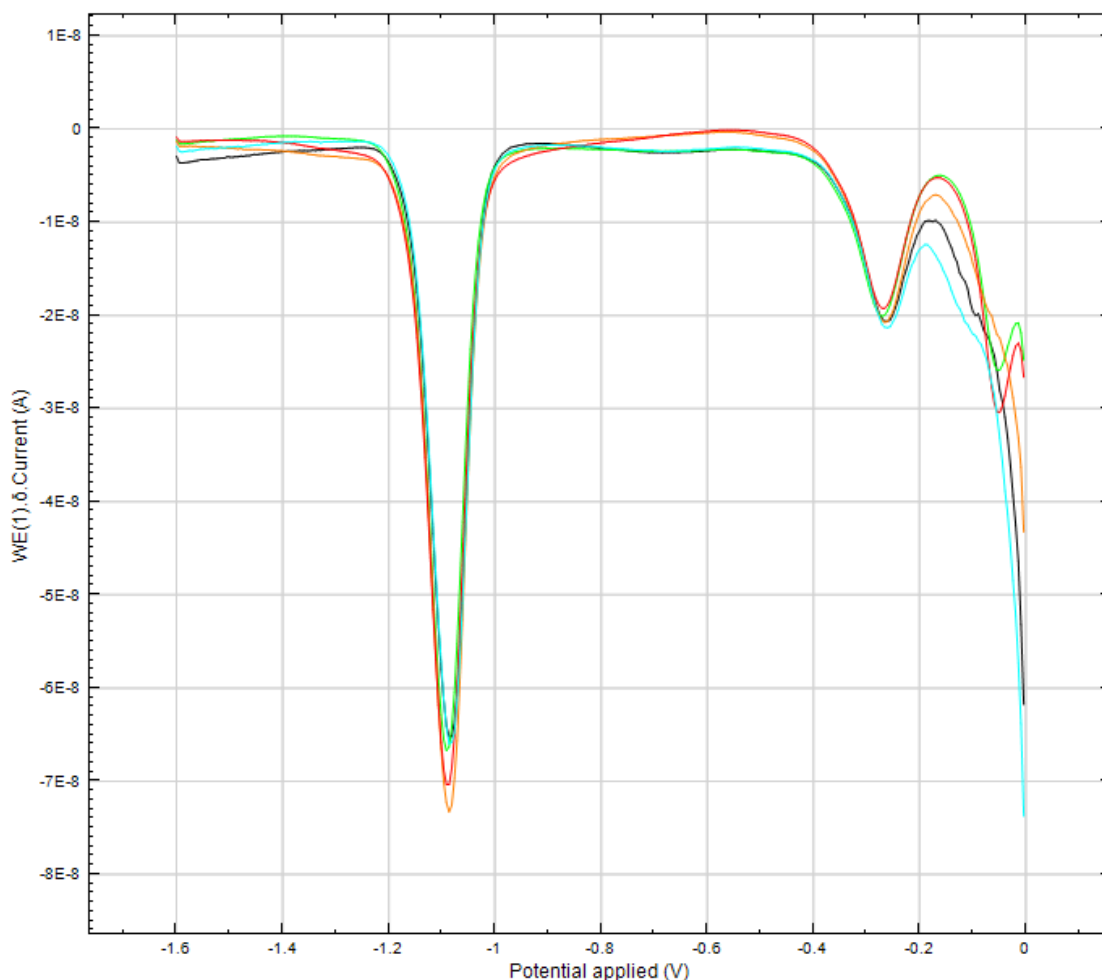
4.1 Úvodní elektrochemické experimenty

Mezi úvodní experimenty patřilo ověření, zda lze elektrochemicky sledovat voltametrický signál citrulinu v přítomnosti měďnaté soli, popř. sledovat změny (pokles či nárůst) v odezvě mědi. Na úvod byla vybrána technika diferenční pulsní voltametrie v kombinaci s visící kapkovou rtuťovou elektrodou.

Výběr základního elektrolytu

Nejprve bylo sledováno chování citrulinu v přítomnosti mědi v prostředí různých elektrolytů, jak znázorňuje obr. 8, kde byl zvolen elektrolyt 0,1M NH_4OH a dále byly proměřeny elektrolyty 0,1M KNO_3 , 0,1M amonný pufr o pH 9,5 (obr. 10) a 0,1M HCl .

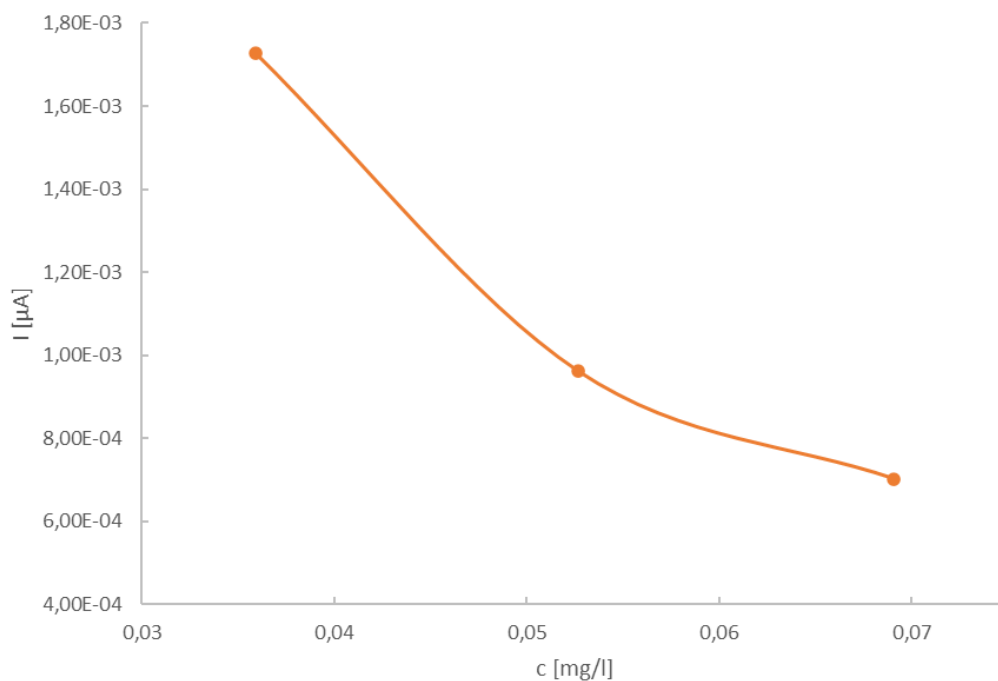
DPV na kapkové rtuťové elektrodě byl změřen elektrolyt 0,1M NH₄OH s přidavkem roztoku mědi o koncentraci 200 ppb. Při hodnotě -1,1 V, -0,27 V a -0,05 V byly pozorovány píky mědi a následně bylo přidáno 0,009-0,175mM roztoku citrulinu (obr. 8). Na přidavek citrulinu reagoval pík při -1,1 V, proto lze usuzovat, že voltametrický signál mědi a citrulinu lze pozorovat při stejném potenciálu. Ostatní pozorované píky nebyly dále vyhodnocovány.



Obrázek 8 DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě v prostředí 0,1M NH₄OH s přidavky a) 100 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,009mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,029mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,079 mM roztoku citrulinu (černá křivka), e) 0,175mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od -1,6 až 0,0 V, potenciálovém kroku 5 mV a amplitudě 25 mV

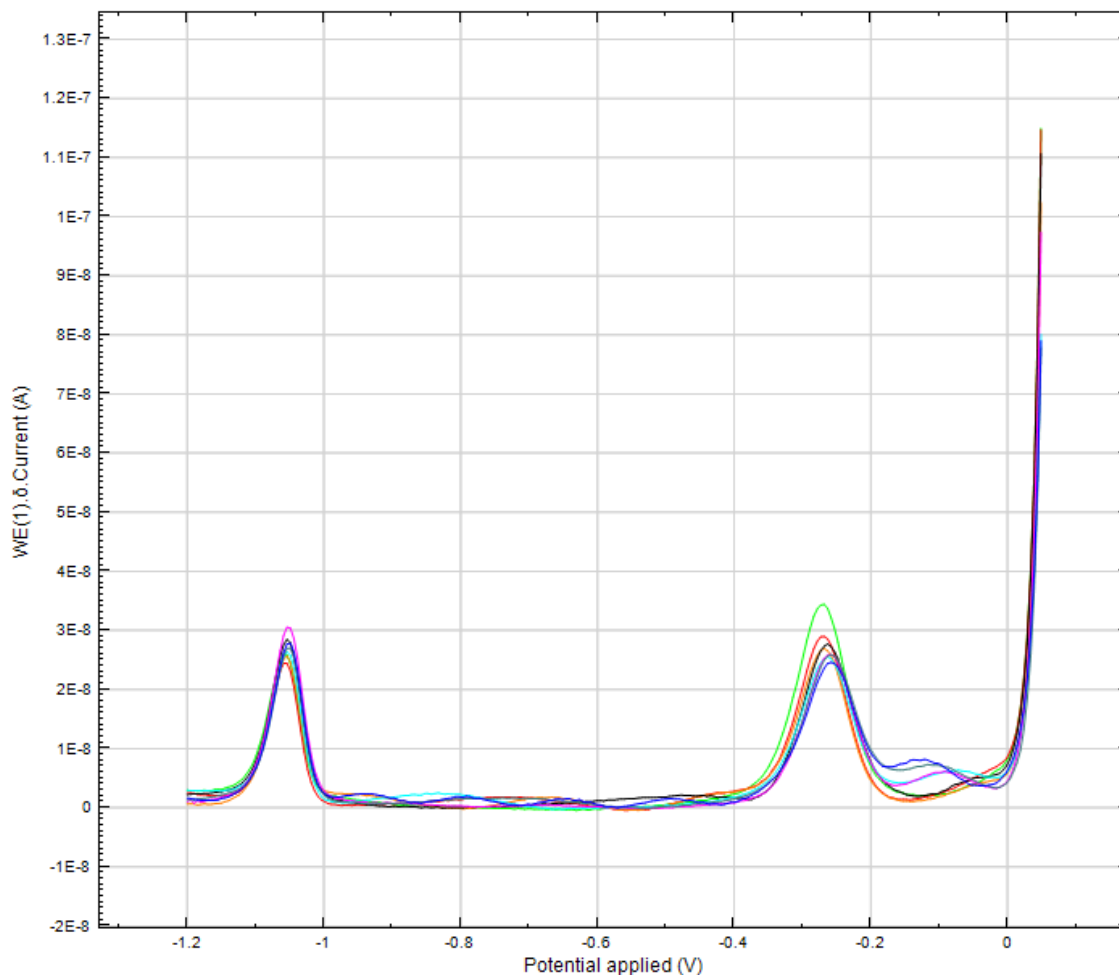
Z vyhodnocení vyplývá, že DPV na kapkové rtuťové elektrodě s elektrolytem 0,1M NH₄OH s přidavkem citrulinu docházelo k nepravidelnému nárůstu a poklesu signálu při -1,1 V, jak je uvedeno na obr. 8.

Podobné měření bylo provedeno v prostředí 0,1M KNO₃ s přidavkem roztoku mědi o koncentraci 100 ppb. Při hodnotě -1,0 V se vytvořil pík mědi a poté bylo přidáno 0,009-0,363 mM roztoku citrulinu. Pozornost byla zaměřena na pík při -1,0 V, kdy u tohoto píku byl sledován pokles signálu mědi po přidavku citrulinu. Z těchto hodnot byla vytvořena třibodová řada klesajícího citrulinu (obr. 9). Z dat vyplývá, že DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě s elektrolytem 0,1M KNO₃ má obdobný průběh jako výše provedené měření s elektrolytem 0,1M NH₄OH.



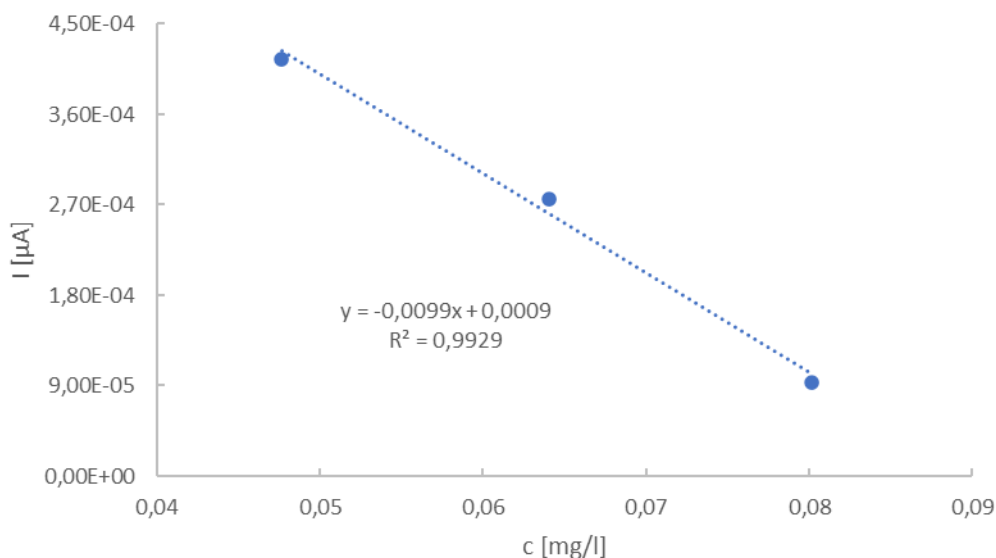
Obrázek 9 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě v prostředí 0,1M KNO₃

Další měření DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě bylo zkoumáno s elektrolytem 0,1M amonným pufrům o pH 9,5 s přidavkem roztoku mědi o koncentraci 100 ppb. Při hodnotě -1,05 V a -0,25 V byly pozorovány píky mědi. Poté bylo přidáno 0,009-0,454mM roztoku citrulinu (obr. 10). U píku při hodnotě -0,25 V byla sledována nepravidelná změna signálu s přidavkem citrulinu.



Obrázek 10 DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě v prostředí amonného pufru o pH 9,5 s přidavky a) 100 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,009mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,029mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,079 roztoku citrulinu (černá křivka), e) 0,175mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), f) 0,269mM roztoku citrulinu (růžová křivka), g) 0,363mM roztoku citrulinu (tmavě zelená křivka), h) 0,454mM roztoku citrulinu (tmavě modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od -1,2 až 0,05 V, potenciálovém kroku 5 mV a amplitudě 25 mV

Z dat vyplývá, že DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě v prostředí 0,1M amonného pufru o pH 9,5 má výraznější pokles signálu než při výše uvedeném měření s elektrolytem 0,1M KNO₃. Z těchto hodnot byla vytvořena klesající třibodová řada citrulinu (obr. 11).



Obrázek 11 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě v prostředí amonného pufru o pH 9,5

Při následném měření DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě bylo měřeno v prostředí HCl s přídatkem roztoku mědi o koncentraci 100 ppb. Při hodnotě -0,37 V byl pozorován pík mědi. Poté bylo do roztoku přidáno 0,098-0,194mM roztoku citrulinu. Z dat vyplývá, že DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě v prostředí HCl není vhodné pro měření mědi s citrulinem, neboť při hodnotě -0,37 V docházelo k nepravidelnému nárůstu a poklesu signálu citrulinu. Z tohoto důvodu nebyl tento elektrolyt dále využit. Nakonec byl DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě ještě testován elektrolyt 0,1M octanový pufr o pH 4,76, který bohužel poskytl nekonzistentní výsledky a získané voltamogramy nebyly dále vyhodnocovány.

Z výše uvedených vyhodnocení je patrné, že nejlepší výsledky s využitím DPV na visící kapkové rtuťové elektrodě poskytoval elektrolyt amonného pufru o pH 9,5. I když by bylo možné tímto způsobem vyvinout metodu na stanovení citrulinu, z principiálního hlediska a vzhledem k potřebám současné elektroanalýzy, jsou více preferovány nertuťové elektrody kvůli toxickým účinkům rtuti.

4.2 Volba měřicí techniky a pracovní elektrody

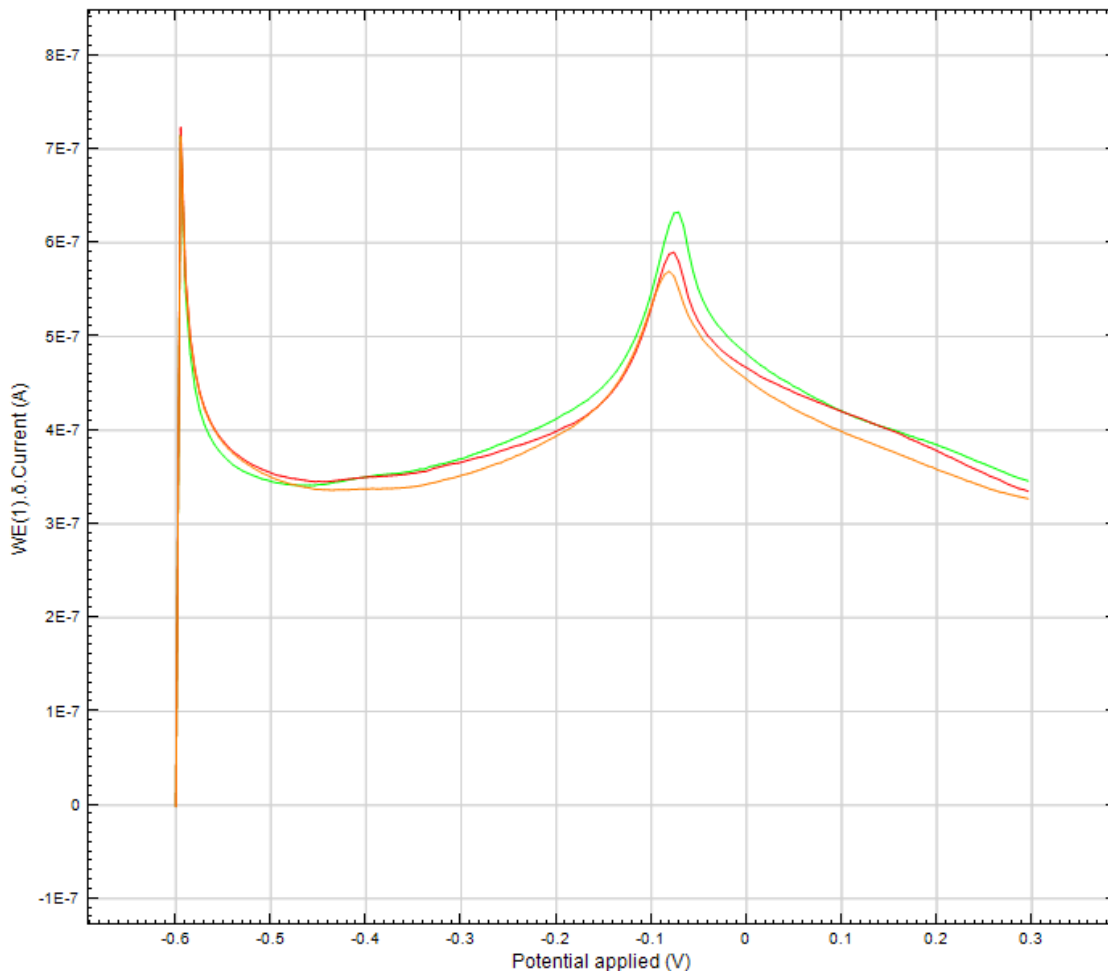
Dále byla věnována pozornost výběru vhodného elektrolytu, měřicí techniky a pracovní elektrody. S pomocí diferenční pulzní voltametrie na elektrodě ze skelného uhlíku (GCE) byly postupně měřeny elektrolyty 0,1M NH₄OH, 0,1M KNO₃, 0,1M octanový pufr o pH 4,76 a 0,1M HCl.

Diferenční pulsní voltametrie na GCE

První z vybraných technik byla DPV v kombinaci s GCE, kdy byla sledována změna voltametričského signálu citrulinu a mědi, v prostředí elektrolytu 0,1M NH₄OH s přídavkem roztoku mědi o koncentraci 200 ppb. Při hodnotě -0,25 V byl pozorován pík mědi. Poté bylo do roztoku přidáno 0,892-1,64mM roztoku citrulinu. Z dat vyplývá, že DPV na GCE s elektrolytem 0,1M NH₄OH není vhodné pro měření mědi s citrulinem, neboť při hodnotě -0,25 V docházelo k nepravidelnému nárůstu a poklesu signálu citrulinu.

Podobné měření DPV na GCE bylo provedeno s elektrolytem 0,1M KNO₃ s přídavkem roztoku mědi o koncentraci 200 ppb. Při hodnotě -0,15 V byl pozorován pík mědi. Poté bylo do roztoku přidáno 0,892-1,64mM roztoku citrulinu. Z dat vyplývá, že DPV na GCE s elektrolytem 0,1M KNO₃ není vhodné pro měření mědi s citrulinem, neboť při hodnotě -0,15 V docházelo k nepravidelnému nárůstu a poklesu signálu citrulinu.

Další měření DPV na GCE bylo zkoumáno s elektrolytem 0,1M octanového pufru o pH 4,76 s přídatkem roztoku mědi o koncentraci 200 ppb. Při hodnotě -0,8 V byl pozorován pík mědi. Poté bylo přidáno 0,892-1,64mM roztoku citrulinu (obr. 12). U píku při hodnotě -0,08 V byl sledován pokles signálu citrulinu.



Obrázek 12 DPV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 s přídatky a) 200 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,892mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 1,64mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), při potenciálovém rozmezí od -0,6 až 0,3 V, potenciálovém kroku 5 mV a amplitudě 25 mV

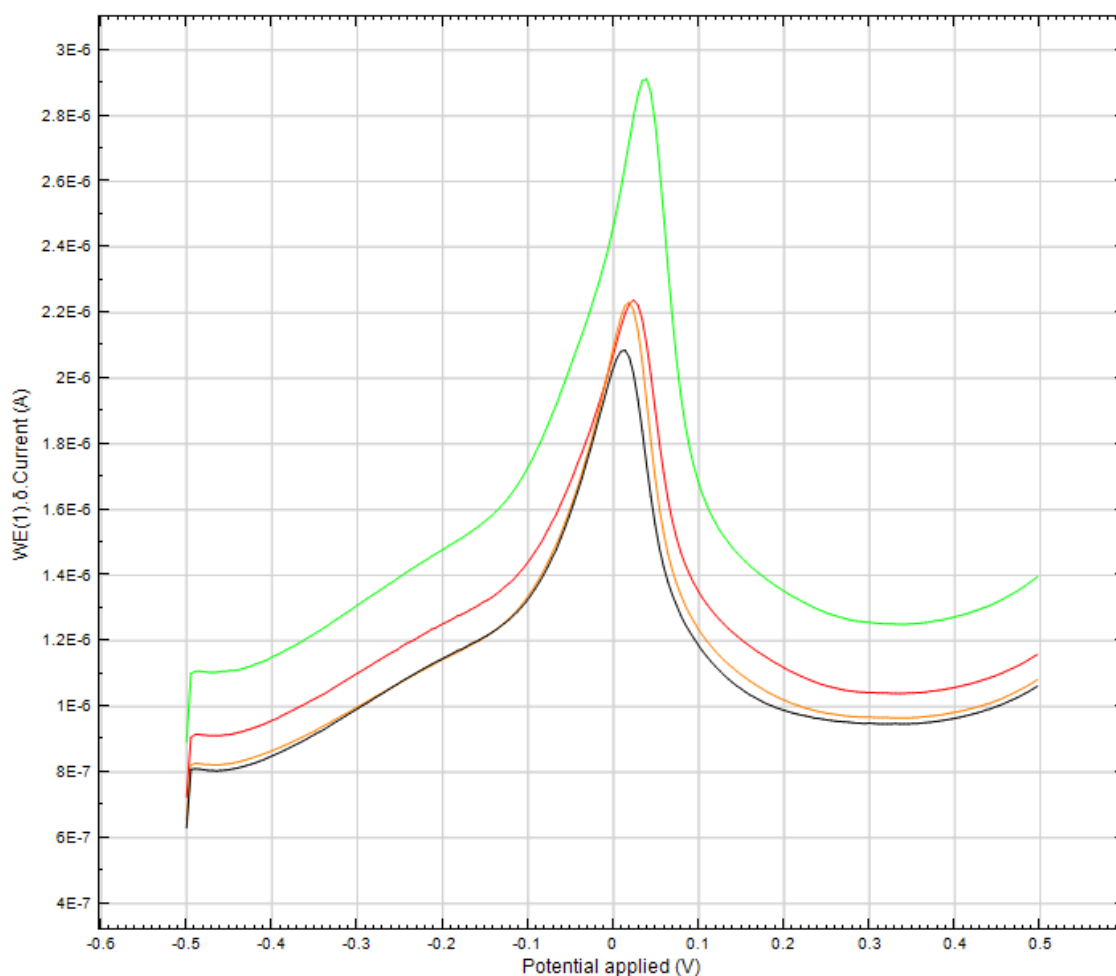
Z dat vyplývá, že DPV na GCE s elektrolytem 0,1M octanového pufru o pH 4,76 je vhodný pro měření mědi s citrulinem, neboť byl sledován pokles signálu citrulinu.

Podobné měření DPV na GCE bylo provedeno s elektrolytem 0,1M HCl s přídatkem roztoku mědi o koncentraci 200 ppb. Při hodnotě -0,17 V byl pozorován pík mědi. Poté bylo do roztoku přidáno 0,892-1,64mM roztoku citrulinu. Z dat vyplývá, že DPV na GCE s elektrolytem 0,1M HCl není vhodné pro měření mědi s citrulinem, neboť při hodnotě -0,17 V docházelo k nepravidelnému nárůstu a poklesu signálu citrulinu.

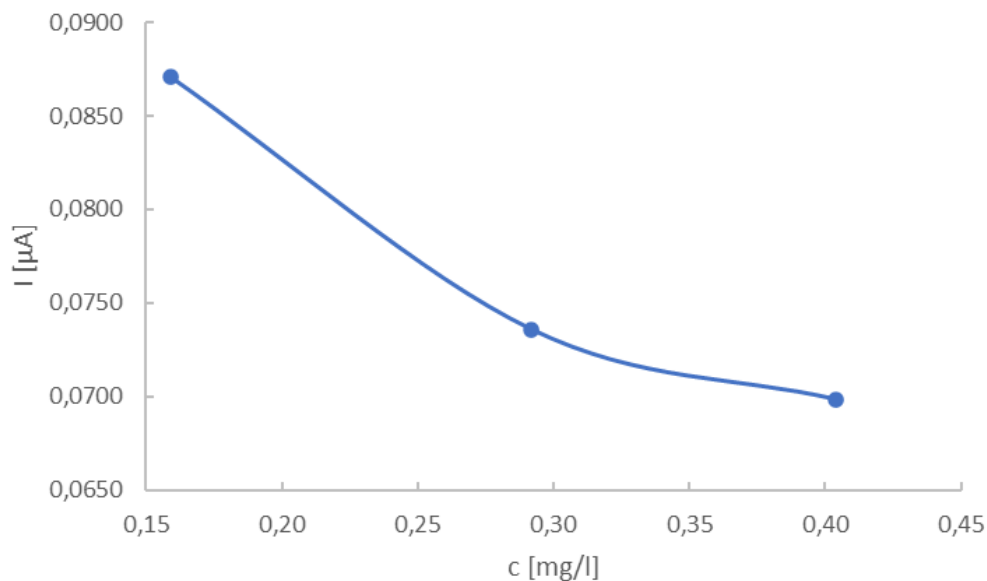
Z výše uvedených měření, vyplývá že nejvhodnější elektrolyt pro měření citrulinu DPV na GCE je 0,1M octanový pufr o pH 4,76. V následujících měřeních byly v elektrolytu 0,1M octanového pufru o pH 4,76 porovnávány měřicí techniky a elektrody. Konkrétně byly zkoumány metody měření jako square-wave voltametrie a voltametrie s lineární změnou napětí na GCE. Porovnáme-li tyto měření s předchozí částí na visící kapkové rtuťové elektrodě (HMDE), vidíme, že je zde patrný vliv elektrody. A proto je nutné testovat různé kombinace technik, elektrod a elektrolytů, jak uvádí níže uvedené kapitoly.

Square-wave voltametrie na GCE

Následně zkoumanou technikou měření byla SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 s přidavkem roztoku mědi o koncentraci 1 ppm. Při hodnotě 0,05 V byl pozorován pík mědi. Poté bylo přidáno 0,892-2,14mM roztoku citrulinu. Pozornost byla zaměřena na pík při 0,05 V, kdy u tohoto píku byl sledován pokles signálu mědi po přidavku citrulinu (obr. 13). Z těchto hodnot byla vytvořena třibodová řada klesajícího citrulinu (obr. 14).



Obrázek 13 SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 s přidavky a) 1 ppm roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,892mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 1,64mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 2,14mM roztoku citrulinu (černá křivka), při potenciálovém rozmezí od -0,5 až 0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz



Obrázek 14 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76

Voltametrie s lineární změnou napětí na GCE

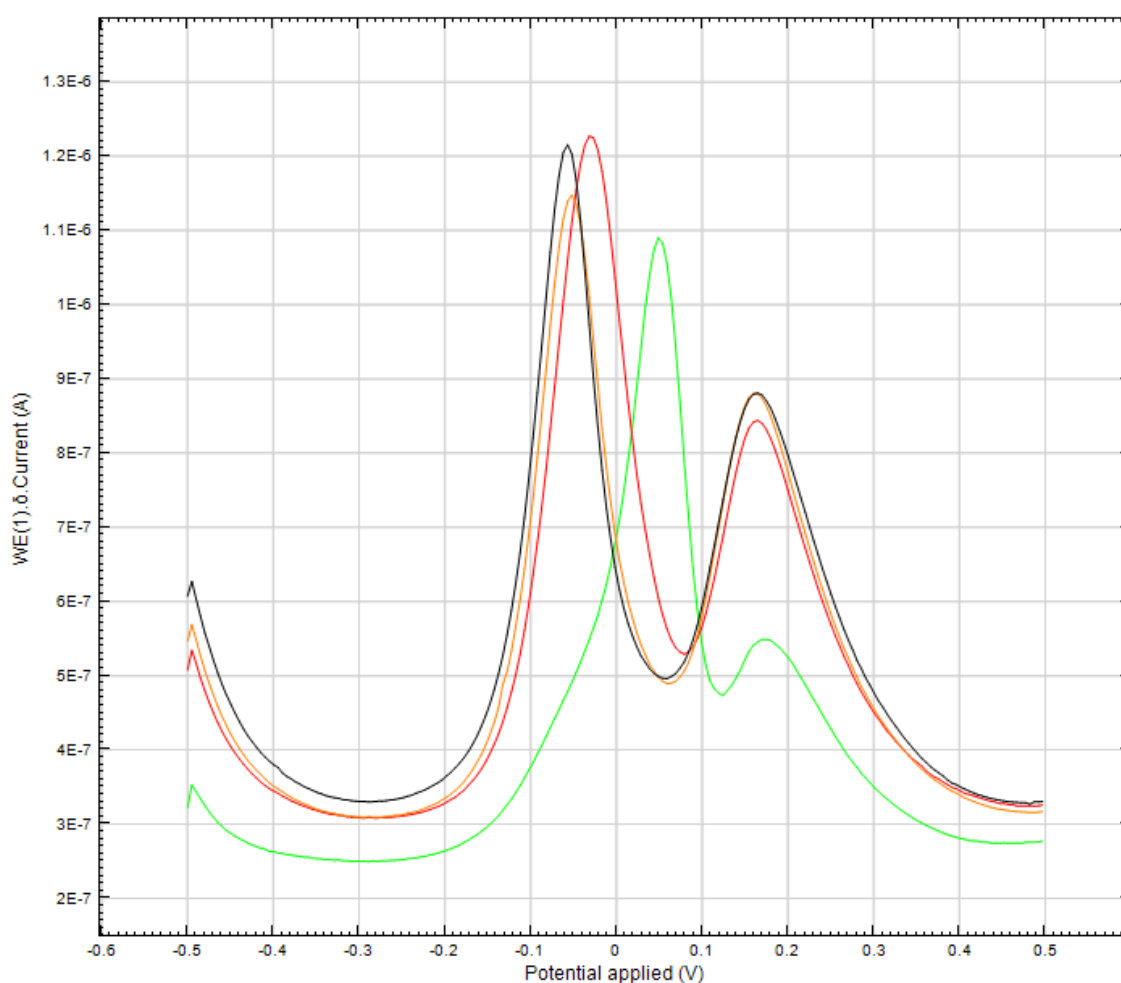
Dále byla zkoušena měření LSV na GCE s 0,1M octanovým pufrům o pH 4,76 s přidavkem roztoku mědi o koncentraci 1 ppm. Při hodnotě 0,0 V byl pozorován pík mědi. Poté bylo do roztoku přidáno 0,892-1,64mM roztoku citrulinu. Z dat vyplývá, že LSV na GCE s elektrolytem 0,1M octanového pufru o pH 4,76 není vhodné pro měření mědi s citrulinem, neboť při hodnotě 0,0 V docházelo k nepravidelnému nárůstu a poklesu signálu citrulinu.

Z výše uvedených měření diferenční pulsní voltametrie, square-wave voltametrie a voltametrie s lineární změnou napětí na GCE v elektrolytu 0,1M octanového pufru o pH 4,76 vyplynulo, že square-wave voltametrie je nejvhodnější měřicí technikou. Následující pasáž byla věnována výběru nejvhodnější elektrody pro square-wave voltametrii v elektrolytu 0,1M octanového pufru o pH 4,76, a to konkrétně elektrody GCE, GCPE, CPE a zlatá elektroda.

Square-wave voltametrie na GCPE

Z výše uvedených měření byla jako nejvhodnější technika pro měření citrulinu vyhodnocena SWV v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76. Nyní se budeme věnovat nalezení vhodné elektrody k SWV s daným elektrolytem, kterým jsou věnovány následující měření.

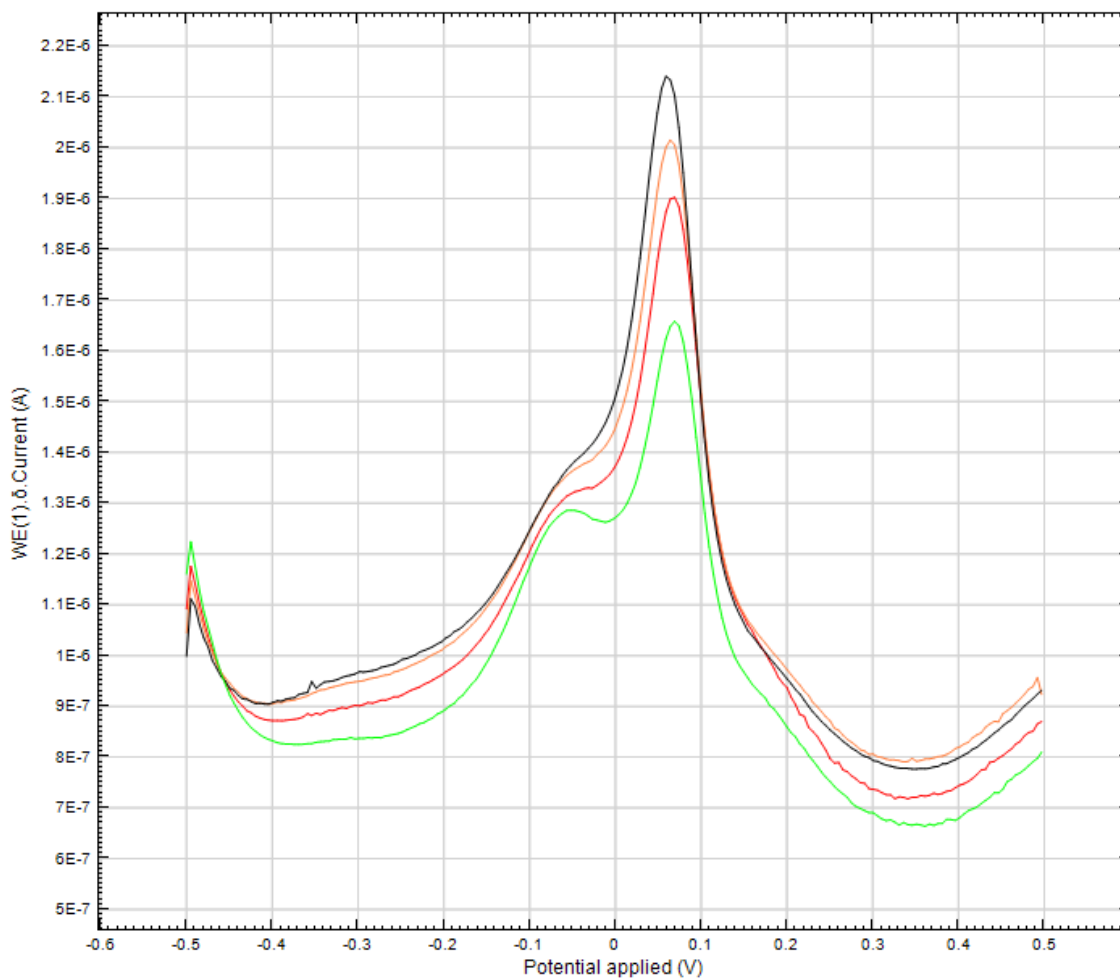
První vybranou elektrodou pro měření SWV s elektrolytem 0,1M octanového pufru o pH 4,76 byla pastová elektroda ze skelného uhlíku (GCPE) s přídavkem roztoku mědi o koncentraci 1 ppm. Při hodnotě 0,05 V a 0,18 V byly pozorovány píky mědi. Poté bylo přidáno 0,892-2,14mM roztoku citrulinu. Pozornost byla zaměřena na pík při 0,05 V, kdy u tohoto píku byla sledována nepravidelná změna signálu s přidavkem citrulinu (obr. 15) a celkový posun píku, který mohl být způsoben tvorbou filmu mědi na elektrodě. Zbylý pozorovaný pík nebyl dále vyhodnocován.



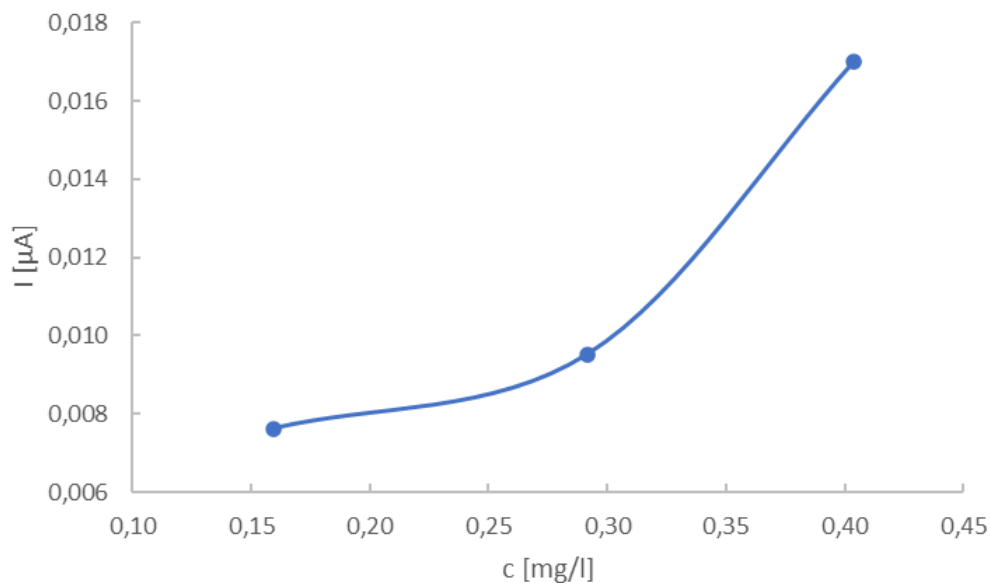
Obrázek 15 SWV na GCPE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 s přídavky a) 1 ppm roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,892mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 1,64mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 2,14mM roztoku citrulinu (černá křivka), při potenciálovém rozmezí od -0,5 až 0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz

Square-wave voltametrie na CPE

Další měření SWV v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 bylo provedeno s uhlíkovou pastovou elektrodou (CPE) s přidavkem roztoku mědi o koncentraci 1 ppm. Při hodnotě 0,06 V a -0,05 V byly pozorovány píky mědi. Poté bylo přidáno 0,892-2,14mM roztoku citrulinu (obr. 16). Pozornost byla zaměřena na pík při 0,06 V, kdy u tohoto píku byl sledován nárůst signálu citrulinu. S narůstajícím signálem citrulinu původně vzniklý pík při hodnotě -0,05 V postupně mizel. Z těchto hodnot byla vytvořena tříbodová řada rostoucího signálu citrulinu (obr. 17).



Obrázek 16 SWV v prostředí octanového pufru o pH 4,76 na CPE s přidavky a) 1 ppm roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,892mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 1,64mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 2,14mM roztoku citrulinu (černá křivka), při potenciálovém rozmezí od -0,5 až 0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz



Obrázek 17 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV v prostředí octanového pufru o pH 4,76 na CPE

Square-wave voltametrie na zlaté elektrodě

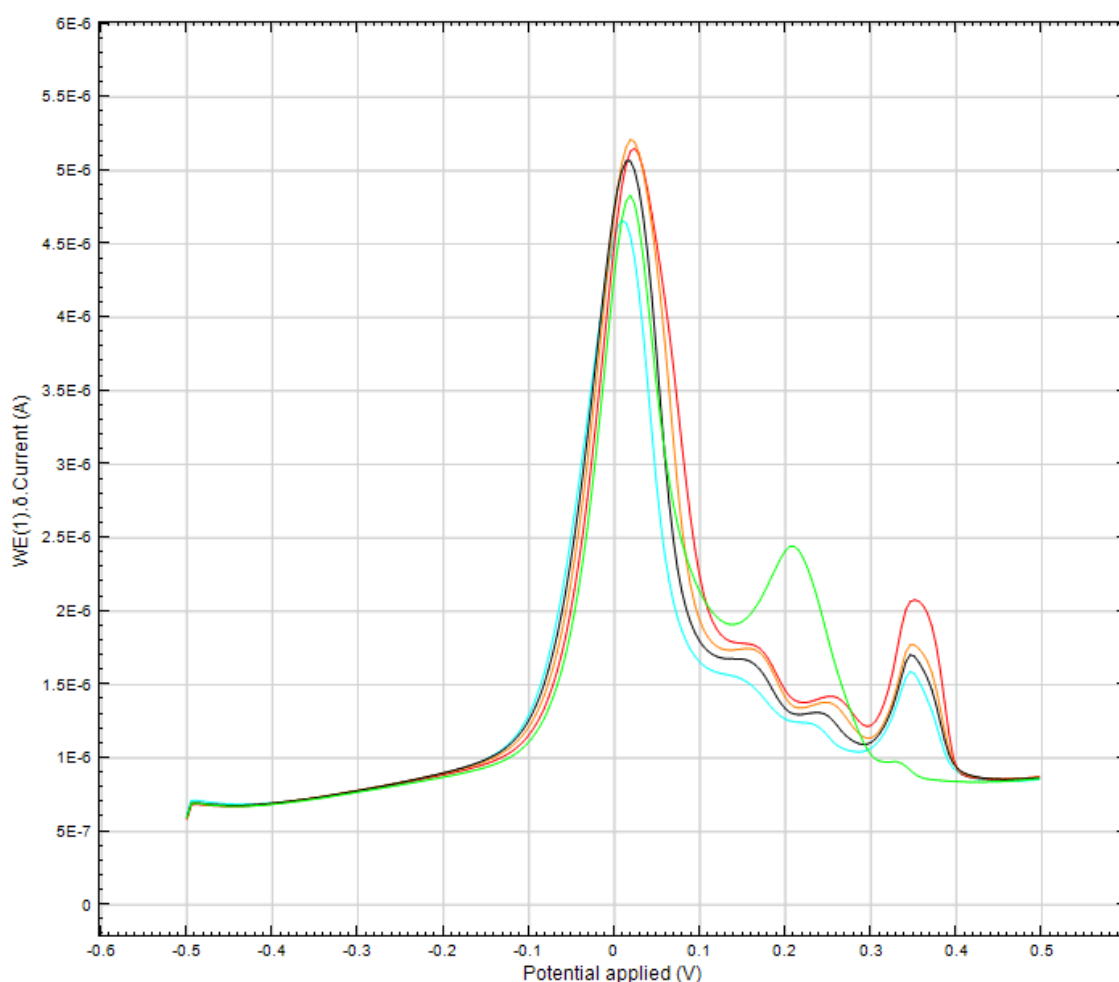
Následné měření SWV s elektrolytem 0,1M octanového pufru o pH 4,76 bylo zkoumáno na zlaté elektrodě s přidavkem roztoku mědi o koncentraci 1 ppm. Při hodnotě 0,2 V a 0,67 V byly pozorovány píky mědi. Poté bylo do roztoku přidáno 0,892-1,64mM roztoku citrulinu. Z dat vyplývá, že SWV s elektrolytem 0,1M octanového pufru o pH 4,76 na zlaté elektrodě není vhodné pro měření mědi s citrulinem, neboť při hodnotě 0,2 V a 0,67 V docházelo k nepravidelnému nárůstu a poklesu signálu citrulinu.

Z výše provedených měření square-wave voltametrie v elektrolytu 0,1M octanového pufru o pH 4,76 na elektrodách GCE, GCPE, CPE a zlaté elektrodě vyplynulo, že nejvhodnější pro square-wave voltametrii v elektrolytu 0,1M octanového pufru o pH 4,76 je elektroda GCE. Z tohoto důvodu byla další měření realizována kombinací technikou square-wave voltametrie, elektrodou GCE a elektrolytu 0,1M octanového pufru o pH 4,76.

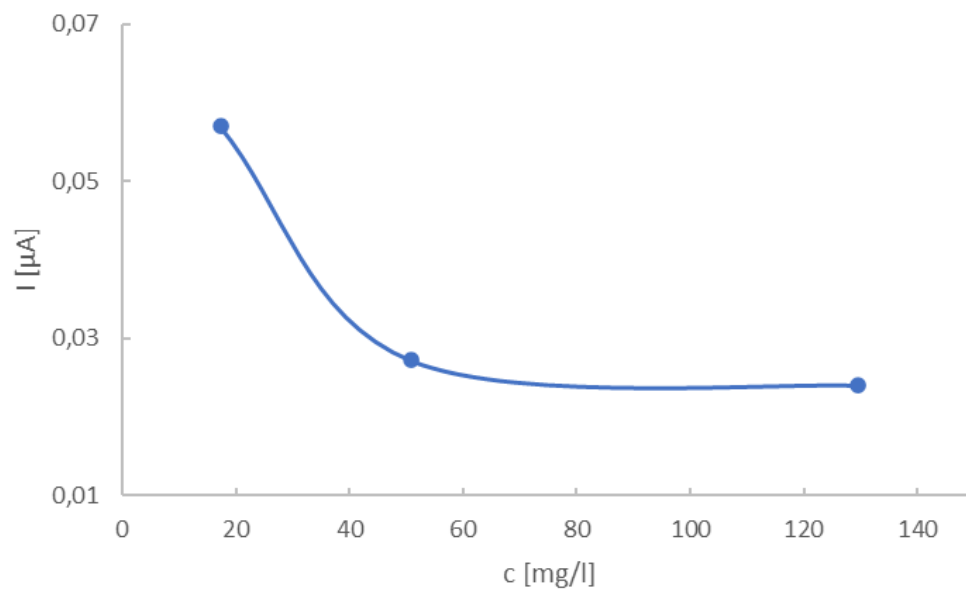
4.3 Vliv akumulace mědi

Vzhledem k předpokladu že při negativním potenciálu se může vylučovat měď z roztoku byla zkoumána její akumulace a případné využití pro zvýraznění rozdílu mezi signály mědi a citrulinu. Před samotným skenem byl zahrnut akumulací krok po dobu 60 s.

Nejprve bylo měřeno SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 při akumulaci 60 s s přidavkem roztoku mědi o koncentraci 250 ppb. Při hodnotě 0,02 V a 0,21 V byly pozorovány píky mědi. Poté bylo do roztoku přidáno 0,098-1,49mM roztoku citrulinu (obr. 18). U píku při 0,02 V byl sledován nepravidelný nárůst a pokles signálu citrulinu. Vzniklý pík mědi při hodnotě 0,21 V byl po přidavcích citrulinu rozdělen na dva píky (0,17 V a 0,25 V) s klesajícím signálem. Pozornost byla věnována píku při hodnotě 0,35 V, u kterého byl sledován pokles signálu citrulinu, který vznikl při přidavcích citrulinu. Z těchto hodnot byla vytvořena čtyřbodová řada klesajícího citrulinu (obr. 19).



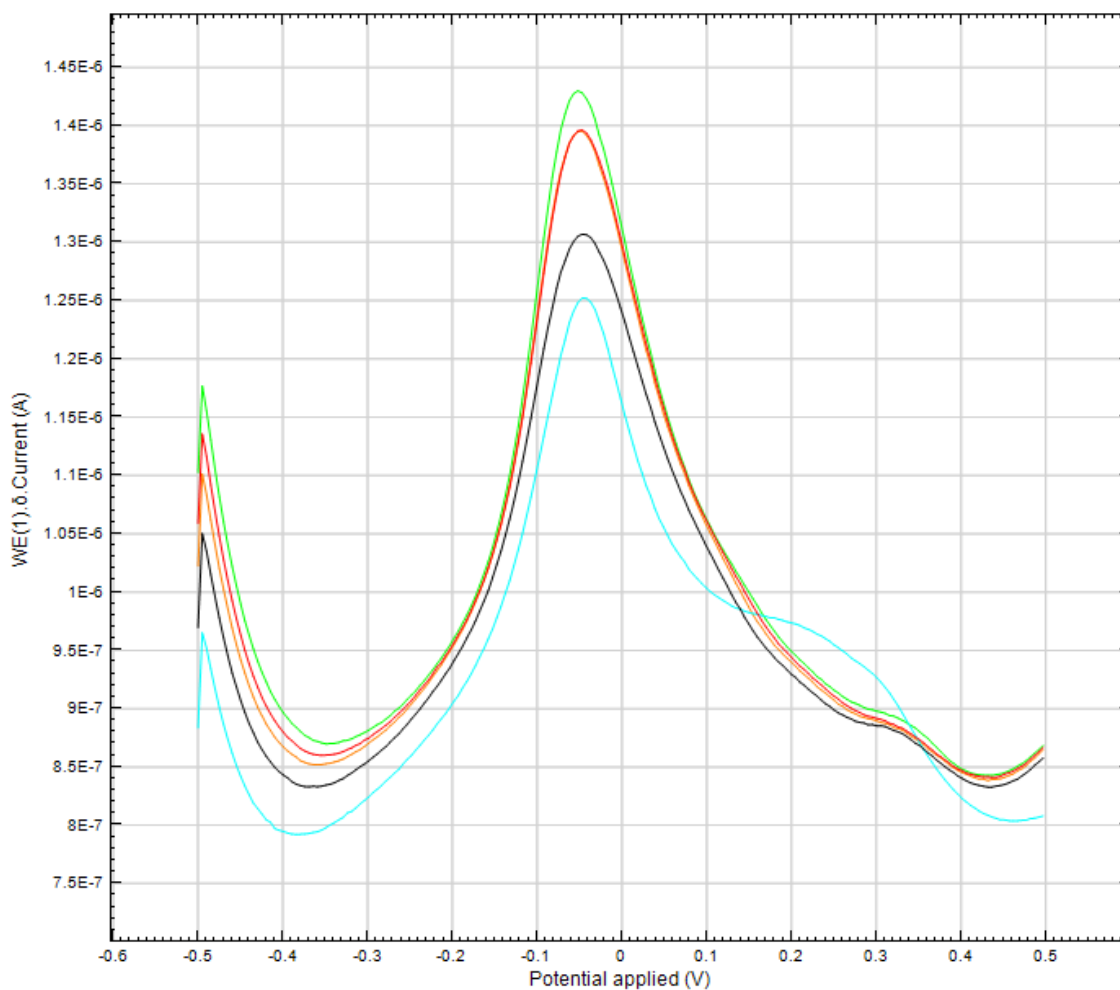
Obrázek 18 SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 s přidavky a) 250 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,098mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,194mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,452mM roztoku citrulinu (černá křivka), e) 1,49mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od -0,5 až 0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV, frekvenci 25 Hz a akumulací krokem 60 s



Obrázek 19 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v 0,1M octanovém pufru o pH 4,76, při akumulčním kroku 60 s

Měření mědi a citrulinu bez akumulčního kroku

Další měření SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 bylo provedeno bez akumulčního kroku s přidavkem roztoku mědi o koncentraci 250 ppb. Při hodnotě -0,05 V byl pozorován pík mědi. Poté bylo do roztoku přidáno 0,098-1,49mM roztoku citrulinu (obr. 20). U píku při -0,05 V byl sledován pokles signálu citrulinu. Z obr. 20 je patrné, že i bez akumulčního kroku může nastat akumulace na elektrodě, jak je vidět při počátečním potenciálu -0,5 V.

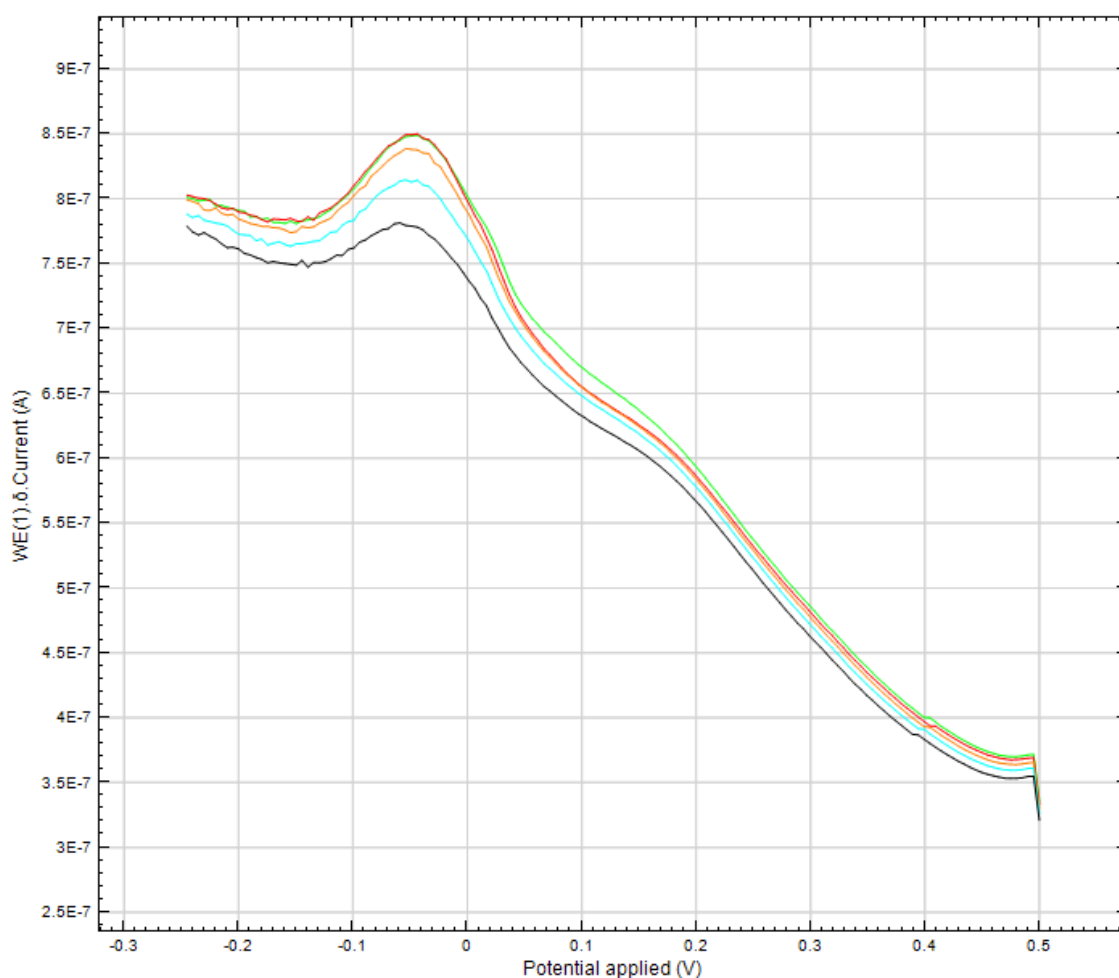


Obrázek 20 SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 s přidavky a) 250 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,098mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,194mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,452mM roztoku citrulinu (černá křivka), e) 1,49mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od -0,5 až 0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV, frekvenci 25 Hz a bez akumulčního kroku

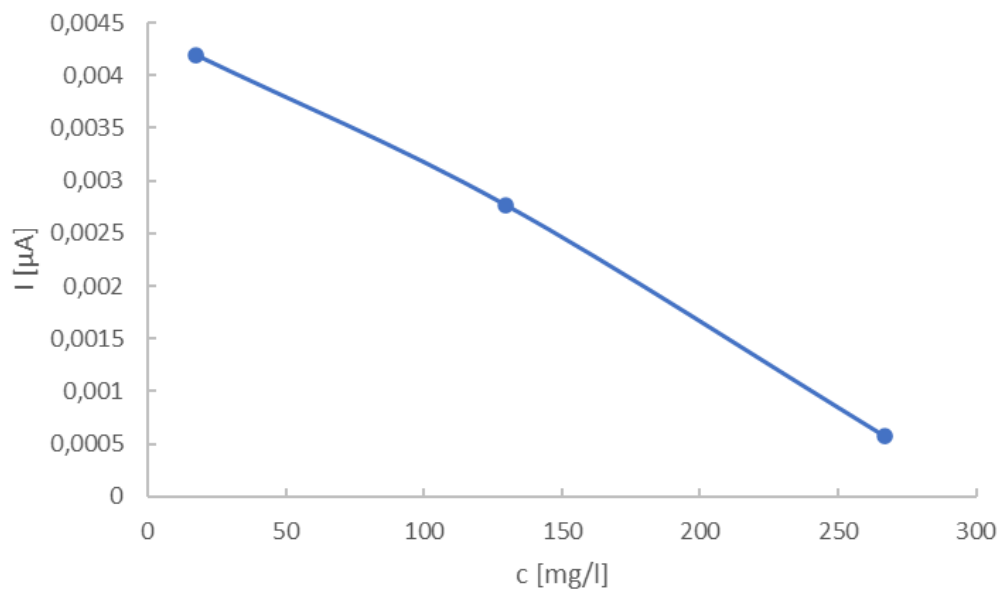
Následně bylo zkoumáno rozmezí potenciálu, při kterém se bude dále měřit a zda-li má potenciálové rozmezí vliv na měření.

Měření mědi a citrulinu bez akumulčního kroku při potenciálovém rozmezí 0,5 až -0,25 V

Z výše uvedených důvodů byl zvolen počáteční potenciál v kladné oblasti. Následné měření SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 bylo provedeno bez akumulčního kroku s přidávkem roztoku mědi o koncentraci 250 ppb. Při hodnotě -0,05 V byl pozorován pík mědi. Poté bylo do roztoku přidáno 0,098-1,49mM roztoku citrulinu (obr. 21). U píku při -0,05 V byl sledován pokles signálu citrulinu. Z těchto hodnot byla vytvořena klesající třibodová řada citrulinu (obr. 22). Jak je patrné při porovnání obr. 20 a 21 tato změna má výrazný vliv na velikost signálu. Nicméně i zde dochází k poklesu citrulinu s jeho přidávkou.



Obrázek 21 SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76 s přidávkou a) 250 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,098mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,194mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,452mM roztoku citrulinu (černá křivka), e) 1,49mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od 0,5 až -0,25 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV, frekvenci 25 Hz a bez akumulčního kroku



Obrázek 22 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí 0,1M octanového pufru o pH 4,76, při potenciálovém rozmezí 0,5 až -0,25 V a bez akumulčního kroku

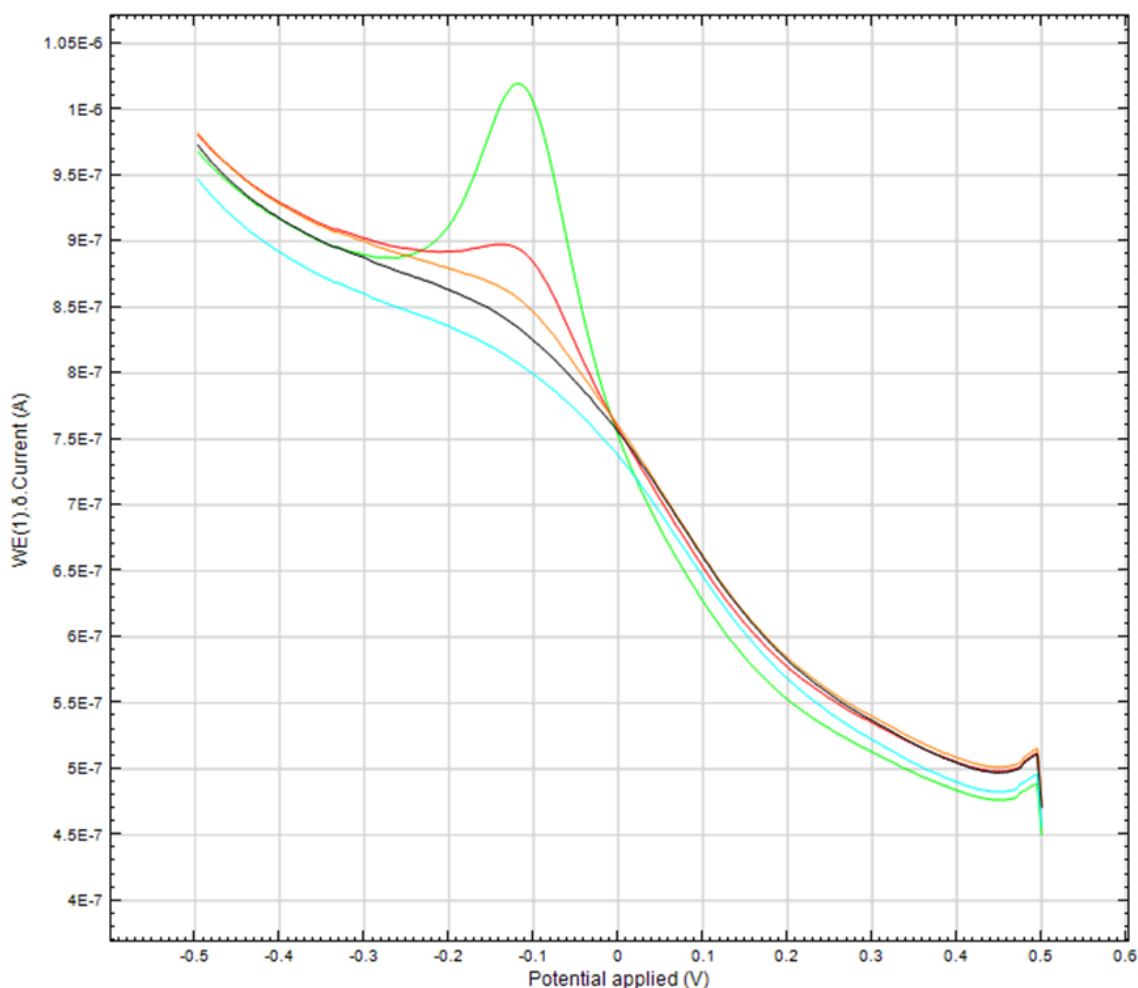
Akumulace sice vede ke zvýšení signálu mědi, ale nepomáhá ke zvýšení citlivosti stanovení citrulinu, jelikož patrně dochází k akumulaci mědi na elektrodě nejen z volné mědi v roztoku, ale i k akumulaci mědi z komplexu. Z tohoto důvodu byla další měření prováděna v potenciálovém rozmezí 0,5 až -0,5 V.

4.4 Vliv pH v prostředí Britton-Robinsonova pufru

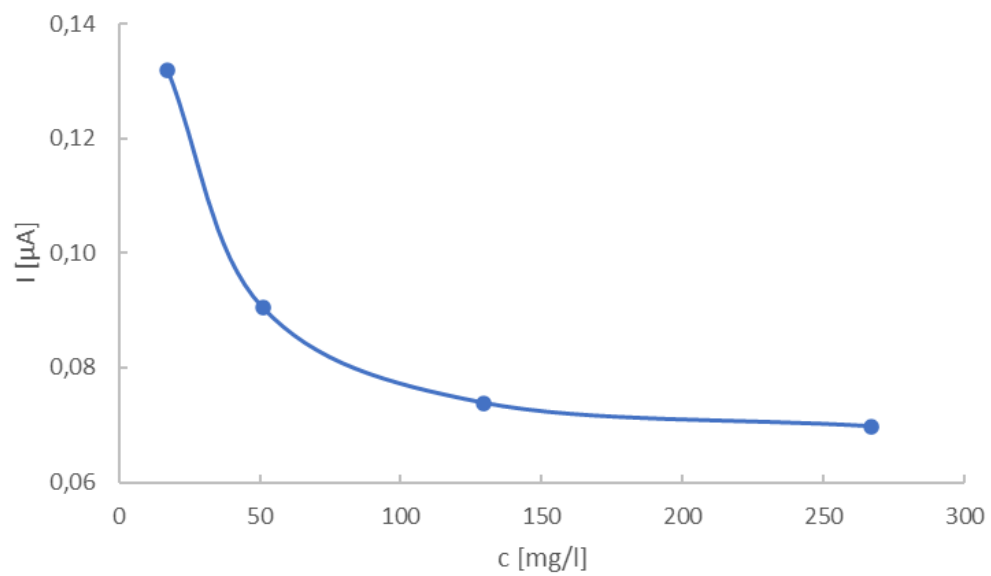
Na základě dosažených výsledků bylo přistoupeno k tomu, že pro další měření bude použit Britton-Robinsonův pufr (BRB) o pH 7,27, 6,32, 5,63, 4,23 a 3,22. Měření bylo provedeno technikou SWV na GCE, v potenciálovém rozmezí 0,5 až -0,5 V, při potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz.

SWV na GCE v BRB o pH 7,27

Nejprve bylo měřeno SWV na GCE s elektrolytem BRB o pH 7,27 s přidavkem roztoku mědi o koncentraci 500 ppb. Při hodnotě -0,12 V byl pozorován pík mědi. Poté bylo do roztoku přidáno 0,098-1,49mM roztoku citrulinu (obr. 23). U píku při -0,12 V byl sledován pokles signálu citrulinu. Z těchto hodnot byla vytvořena klesající čtyřbodová řada citrulinu (obr. 24).



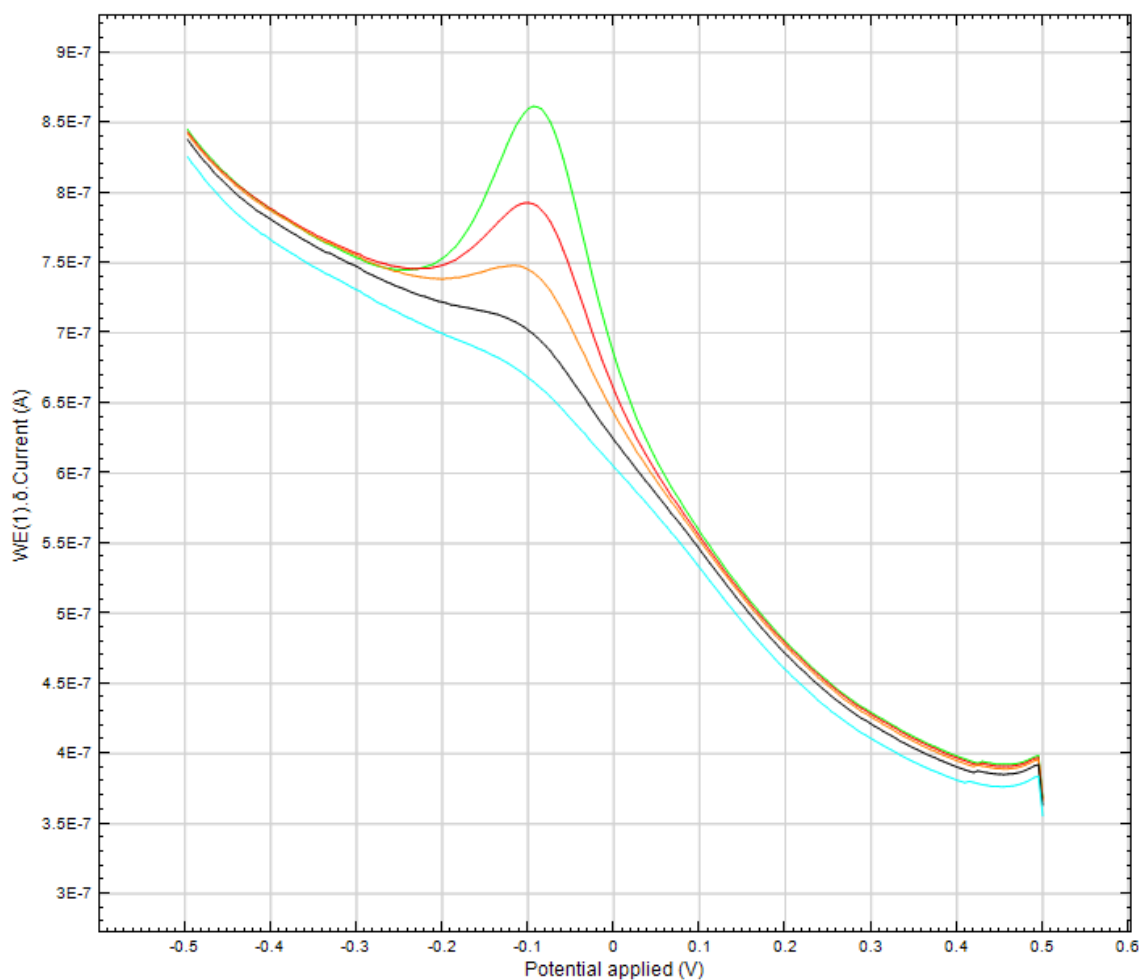
Obrázek 23 SWV na GCE v prostředí BRB o pH 7,27 s přidavky a) 500 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,098mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,194mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,452mM roztoku citrulinu (černá křivka), e) 1,49mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od 0,5 až -0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz



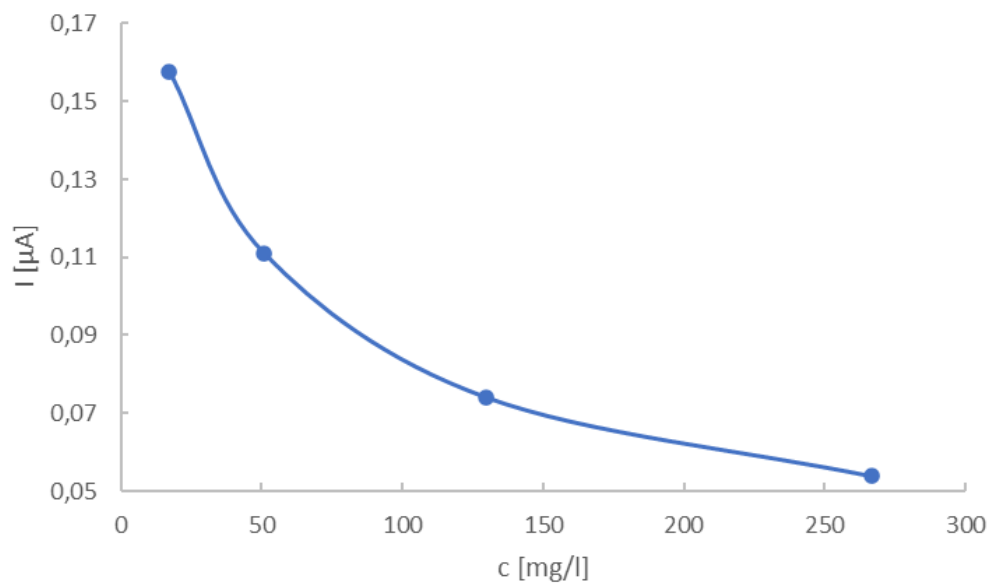
Obrázek 24 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 7,27

SWV na GCE v BRB o pH 6,32

Dále bylo měřeno SWV na GCE v prostředí BRB o pH 6,32 s přidavkem roztoku mědi o koncentraci 500 ppb. Při hodnotě $-0,09$ V byl pozorován pík mědi. Poté bylo do roztoku přidáno $0,098$ - $1,49$ mM roztoku citrulinu (obr. 25). U píku při $-0,09$ V byl sledován pokles signálu citrulinu. Z těchto dat byla vytvořena klesající čtyřbodová řada citrulinu (obr. 26).



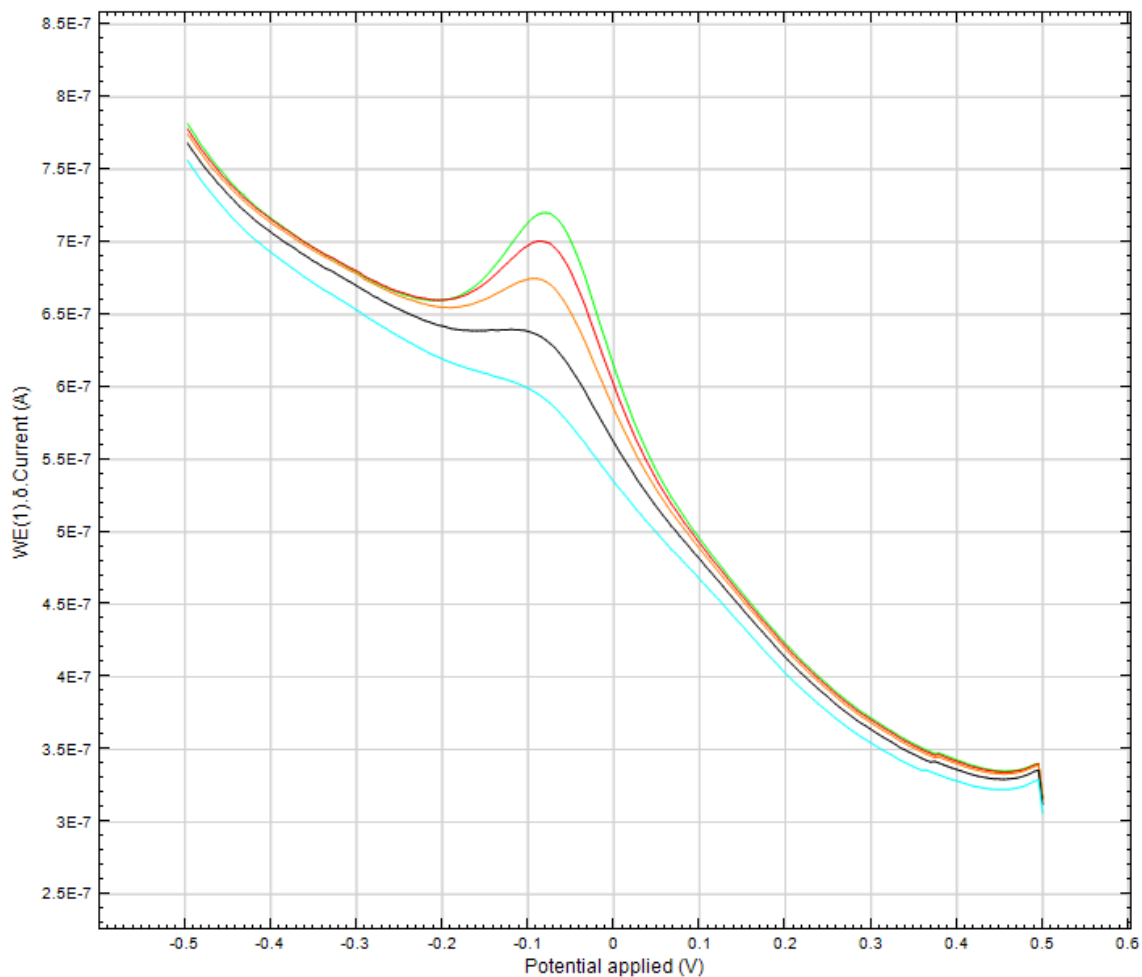
Obrázek 25 SWV na GCE v prostředí BRB o pH 6,32 s přidavky a) 500 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) $0,098$ mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) $0,194$ mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) $0,452$ mM roztoku citrulinu (černá křivka), e) $1,49$ mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od $0,5$ až $-0,5$ V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz



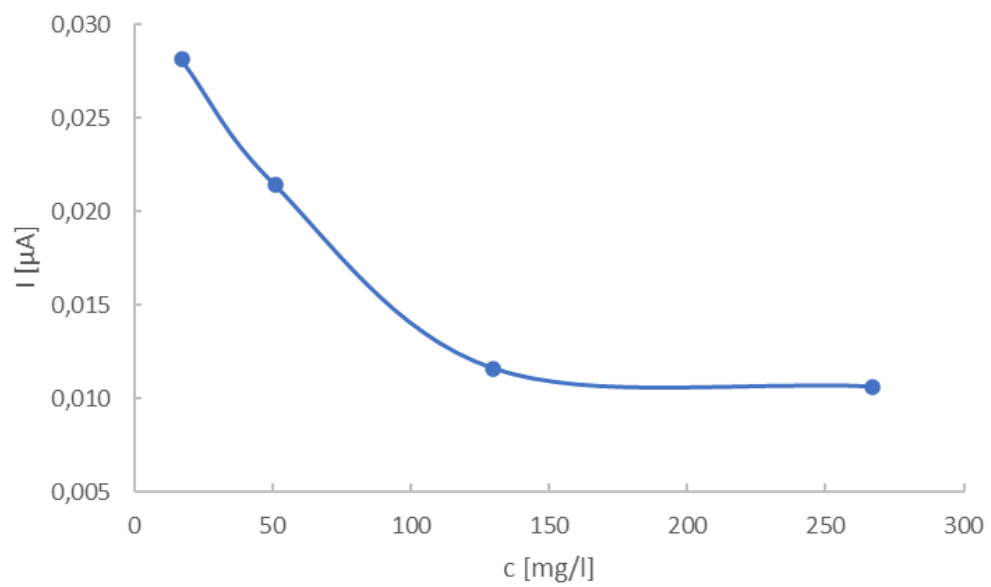
Obrázek 26 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 6,32

SWV na GCE v BRB o pH 5,63

Následně bylo měřeno SWV na GCE s elektrolytem BRB o pH 5,63 s přidavkem roztoku mědi o koncentraci 500 ppb. Při hodnotě -0,08 V byl pozorován pík mědi. Poté bylo do roztoku přidáno 0,098-1,49mM roztoku citrulinu (obr. 27). U píku při -0,08 V byl sledován pokles signálu citrulinu. Z těchto hodnot byla vytvořena klesající čtyřbodová řada citrulinu (obr. 28).



Obrázek 27 SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63 s přidavky a) 500 ppb roztoku mědi (světle zelená křivka), b) 0,098mM roztoku citrulinu (červená křivka), c) 0,194mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,452mM roztoku citrulinu (černá křivka), e) 1,49mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od 0,5 až -0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz



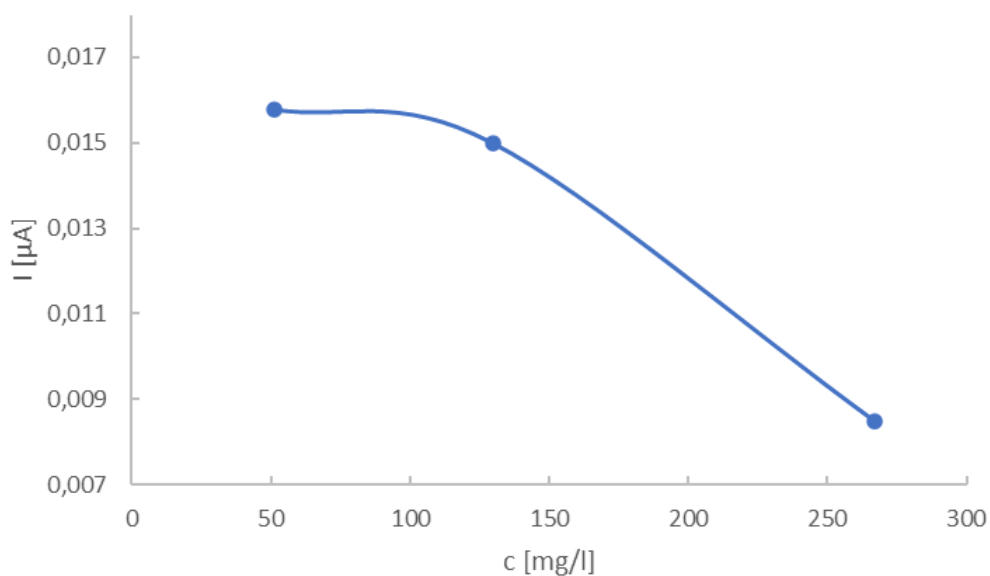
Obrázek 28 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63

SWV na GCE v BRB o pH 4,23

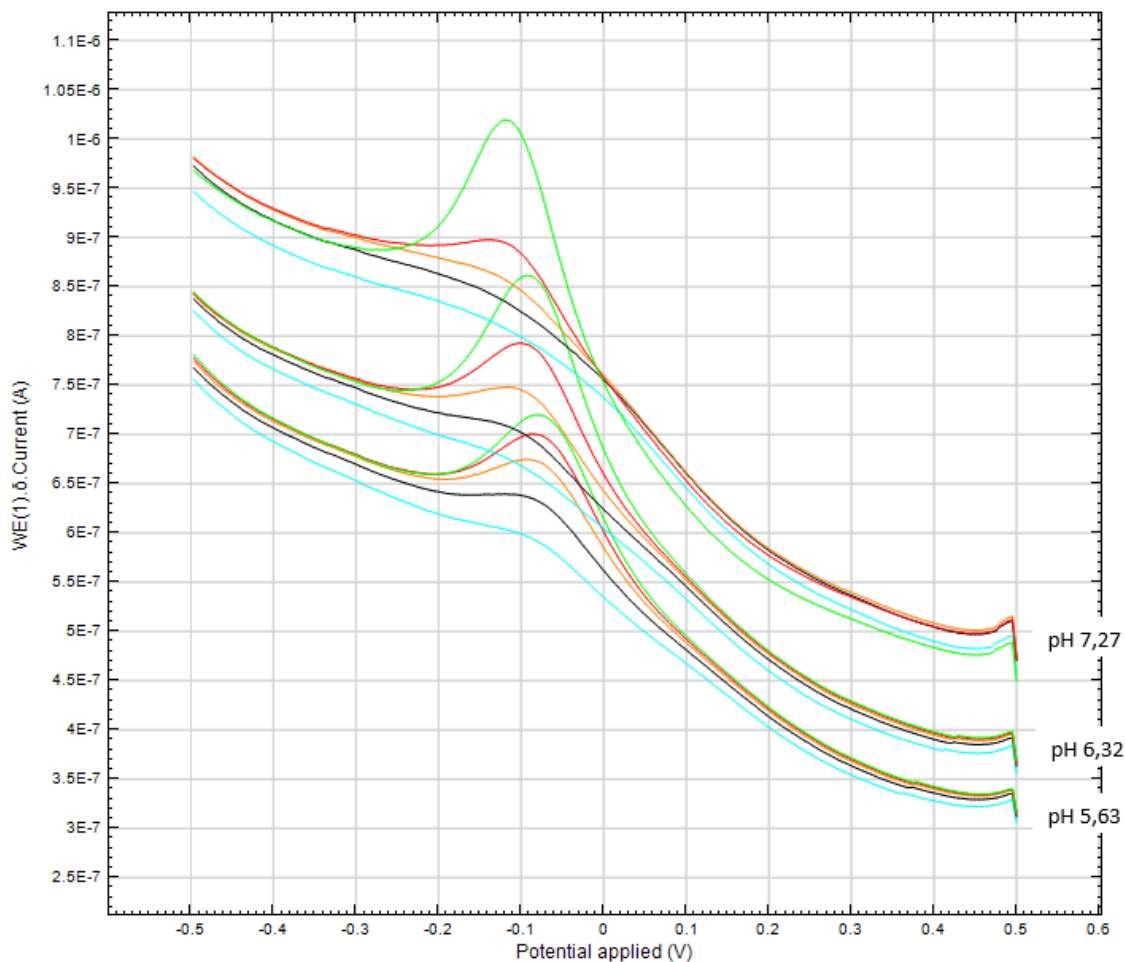
Dále bylo měřeno SWV na GCE s elektrolytem BRB o pH 4,23 s přidavkem roztoku mědi o koncentraci 500 ppb. Při hodnotě -0,02 V byl pozorován pík mědi. Poté bylo do roztoku přidáno 0,098-1,49mM roztoku citrulinu. U píku při -0,02 V byl sledován nepravidelný nárůst a pokles signálu citrulinu.

SWV na GCE v BRB o pH 3,22

Následně bylo měřeno SWV na GCE s elektrolytem BRB o pH 3,22 s přidavkem roztoku mědi o koncentraci 500 ppb. Při hodnotě -0,05 V byl pozorován pík mědi. Poté bylo do roztoku přidáno 0,098-1,49mM roztoku citrulinu. U píku při -0,05 V byl sledován pokles signálu citrulinu. Z těchto hodnot byla vytvořena klesající třibodová řada citrulinu (obr. 29).



Obrázek 29 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 3,22



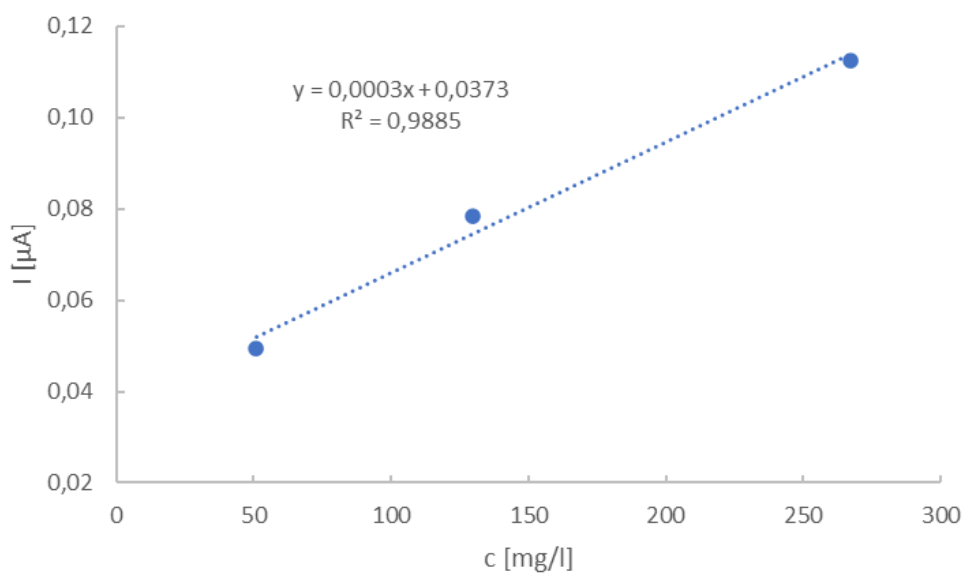
Obrázek 30 Srovnání naměřených záznamů při SWV v prostředí BRB o pH 7,27, 6,32, 5,63, při potenciálovém rozmezí od 0,5 až -0,5 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 20 mV a frekvenci 25 Hz

Optimálního pH BRB, při kterém je nejvhodnější měřit bylo vyhodnoceno z výše uvedených záznamů, které jsou shrnuty v obr. 30. Optimální pH BRB, při kterém je nejvhodnější měřit je 5,63, protože dává nejnižší pozadí. Dále byly metodou SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63 změřen modelový vzorek a vzorky citrulline malate a pump přes metodu kalibrační křivky a vícenásobného standardního přídatku.

4.5 Metoda stanovení citrulinu pomocí tvorby komplexu s mědí

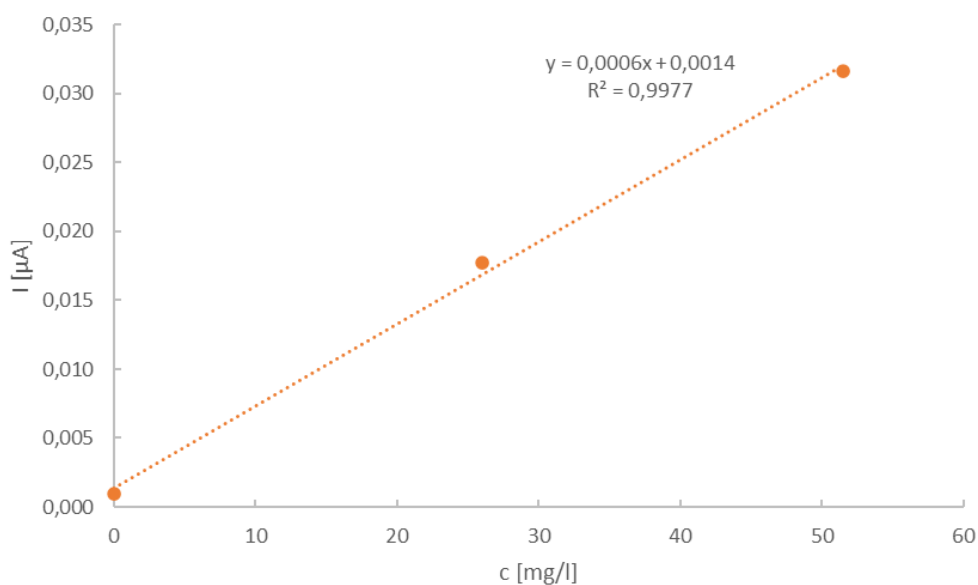
Na základě výše uvedených měření, SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63, byly provedeny stanovení obsahu citrulinu v reálných a modelových vzorcích, kde byly využity metody kalibrační křivka a vícenásobný standardní přídavek pro dané vzorky.

Kalibrační křivka citrulinu měřená v elektrolytu BRB o pH 5,63 na GCE metodou SWV (obr. 31).



Obrázek 31 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63

Křivka vícenásobného standardního přídavku citrulinu pro modelový vzorek měřená v elektrolytu BRB o pH 5,63 na GCE metodou SWV (obr. 32).



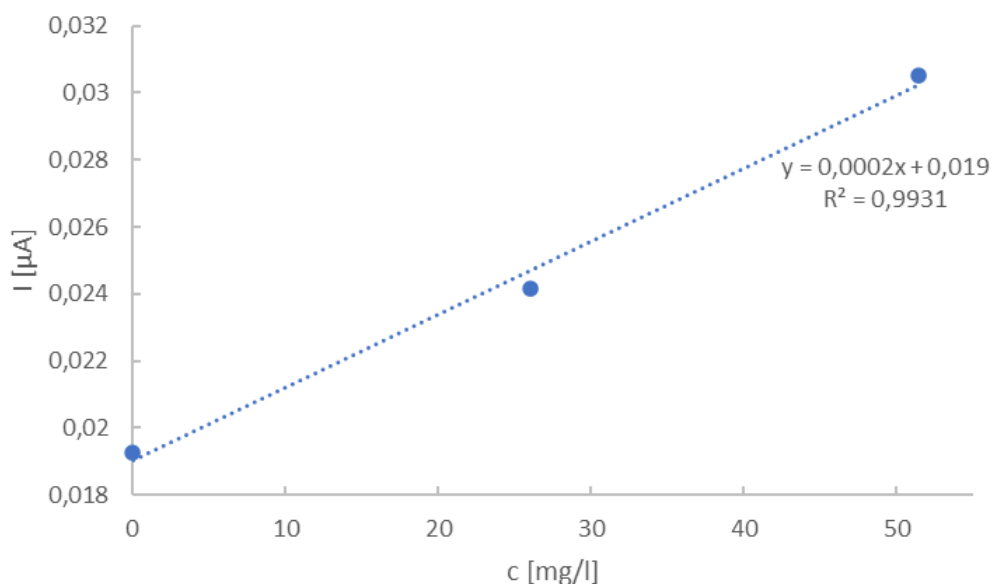
Obrázek 32 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu pro modelový vzorek při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63

Tabulka 1 Naměřené hodnoty v modelovém vzorku při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63

	Modelový vzorek	
Obsah	1 750 mg/l	
Metoda	Kalibrační křivka [mg/l]	Vícenásobný standardní přídavek [mg/l]
BRB o pH 5,63	1 817,67 ± 0,591	1 866,67 ± 12,642

Metodou SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63 bylo stanoveno množství citrulinu v modelovém vzorku metodou kalibrační křivky $1\,817,67 \pm 0,591$ mg/l s výtěžností 103,86 % a metodou vícenásobného standardního přídavku $1\,866,67 \pm 12,642$ mg/l s výtěžností 106,67 %.

Křivka vícenásobného standardního přídavku citrulinu pro vzorek citrulline malate měřená v elektrolytu BRB o pH 5,63 na GCE metodou SWV (obr. 33).



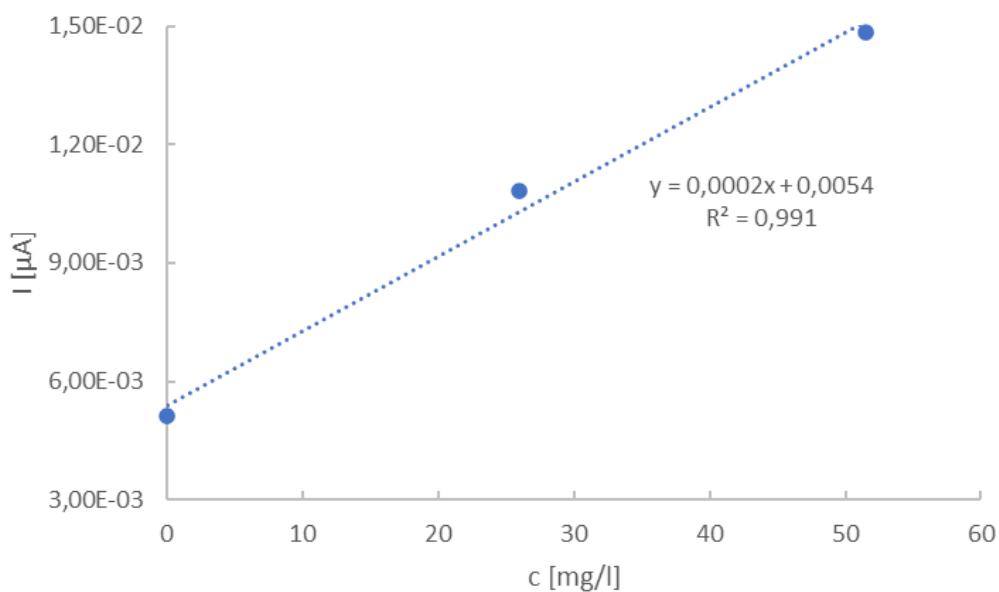
Obrázek 33 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu pro vzorek citrulline malate při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63

Tabulka 2 Naměřené hodnoty ve vzorku citrulline malate při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63

Vzorek Citrulline malate		
Obsah na obalu	666,66 mg/g	
Metoda	Kalibrační křivka [mg/g]	Vícenásobný standardní přírůstek [mg/g]
BRB o pH 5,63	536,95 ± 0,225	542,86 ± 0,048

Metodou SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63 bylo stanoveno množství citrulinu ve vzorku citrulline malate metodou kalibrační křivky $536,95 \pm 0,225$ mg/g a metodou vícenásobného standardního přírůstku $542,86 \pm 0,048$ mg/g.

Křivka vícenásobného standardního přírůstku citrulinu pro vzorek pump měřená v elektrolytu BRB o pH 5,63 na GCE metodou SWV (obr. 34).



Obrázek 34 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu pro vzorek pump při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63

Tabulka 3 Naměřené hodnoty ve vzorku pump při měření SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63

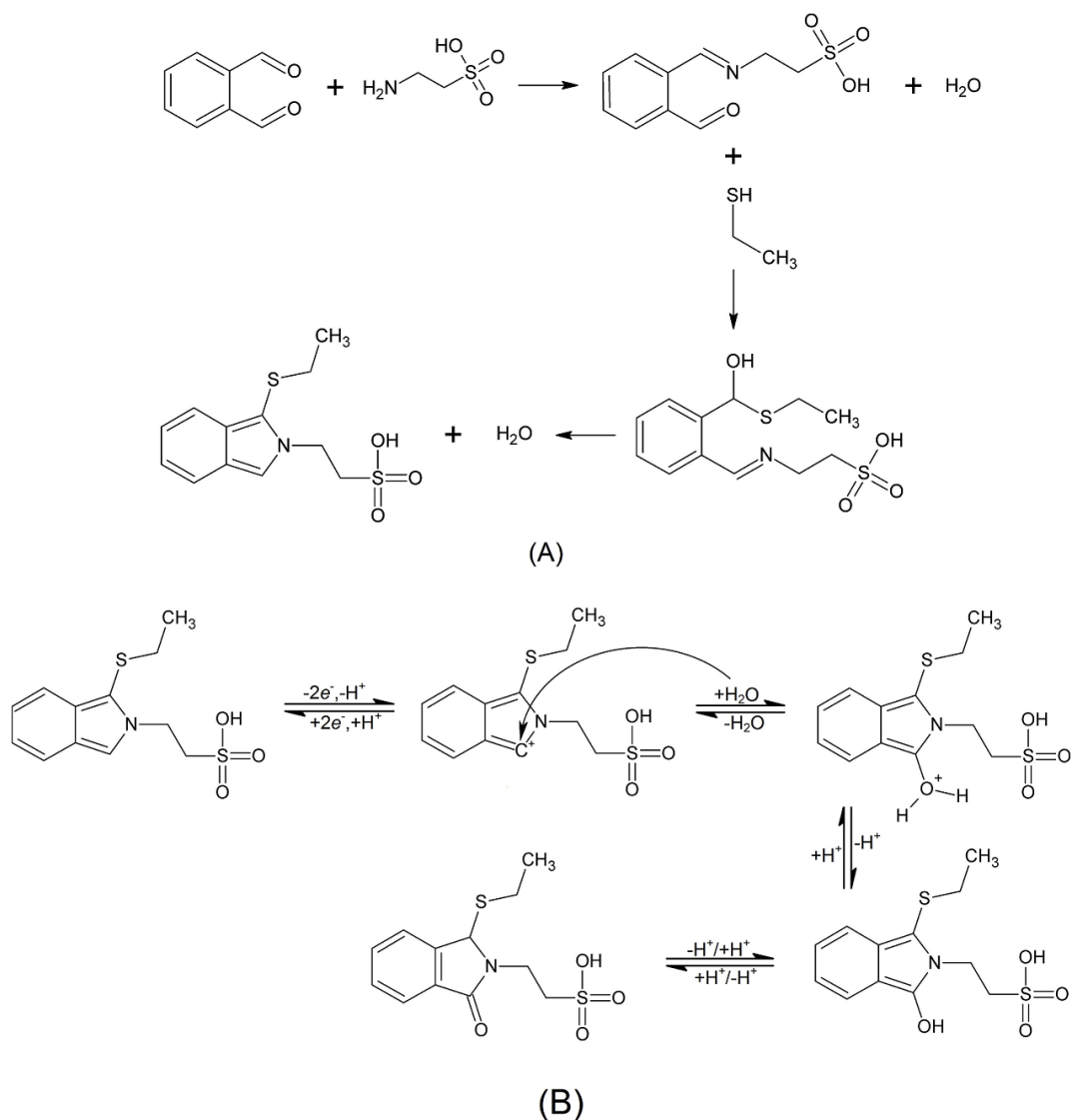
	Vzorek Pump	
Obsah na obalu	222,22 mg/g	
Metoda	Kalibrační křivka [mg/g]	Vícenásobný standardní přídavek [mg/g]
BRB o pH 5,63	613,02 ± 0,225	257,14 ± 0,047

Metodou SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63 bylo stanoveno množství citrulinu ve vzorku pump metodou kalibrační křivky $613,02 \pm 0,225$ mg/g a metodou vícenásobného standardního přídavku $257,14 \pm 0,047$ mg/g. Nalezený vyšší obsah citrulinu může být způsoben tím, že při měření v prostředí BRB o pH 5,63 mohou reagovat i další aminokyseliny a ve vzorku pump je obsažena i aminokyselina taurin, beta-alanin a tyrosin.

Metodou SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63 bylo v modelovém vzorku naměřeno metodou kalibrační křivky $1\,817,67 \pm 0,591$ mg/l citrulinu s výtěžností 103,86 % a metodou vícenásobného přídavku $1\,866,67 \pm 12,642$ mg/l citrulinu s výtěžností 106,67 %. Ve vzorku citrulline malate bylo stanoveno množství citrulinu metodou kalibrační křivky $536,95 \pm 0,225$ mg/g vzorku a metodou vícenásobného standardního přídavku $542,86 \pm 0,048$ mg/g vzorku. Z hodnot uvedených na obalu od firmy Nutrend je obsah citrulinu ve vzorku citrulline malate v poměru 2:1, tedy 666,66 mg/g vzorku. Ve vzorku pump bylo stanoveno množství citrulinu metodou kalibrační křivky $613,02 \pm 0,225$ mg/g vzorku a metodou vícenásobného přídavku $257,14 \pm 0,047$ mg/g vzorku. Z hodnot uvedených na obalu od firmy Nutrend je obsah citrulinu ve vzorku pump v poměru 2:1, tedy 222,22 mg/g vzorku. Značně patrný rozdíl obou metod je způsoben přítomností matrice ve vzorku.

4.6 Elektrochemické stanovení citrulinu po derivatizaci s OPA-ethanthiolem

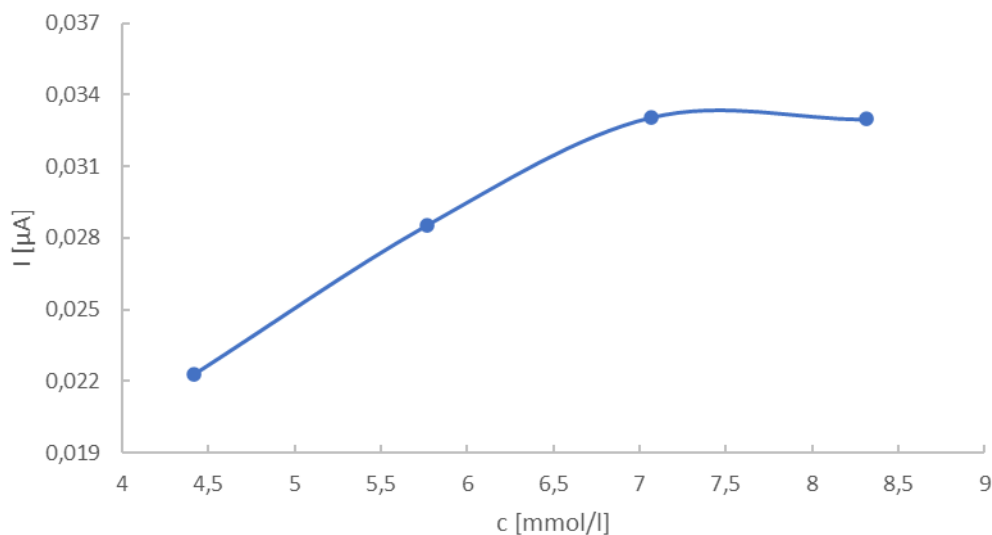
Z dosavadních měření nebyly zjištěné hladiny citrulinu dostatečně průkazné, proto budou v další pasáži zkoumány derivatizace, kde nebyl kladen důraz na mechanismus s předpokladem, že se citrulin bude chovat stejně jako zkoumané aminokyseliny. Nejdříve je věnována pozornost derivatizaci citrulinu s OPA-ethanthiolem. Postupovalo se podle nalezeného článku o voltametrickém stanovení taurinu v energetických nápojích po OPA-ethanthiol derivatizaci (obr. 35) od A. S. Farag a kolektiv [37].



Obrázek 35 Derivatizační reakce aminokyseliny taurinu s OPA v přítomnosti ethanthiolu (A). Navrhované EC-oxidační dráhy OPA-ethanthiolového derivátu taurinu (B) [37].

Zkoumání optimálního množství ethanthiolu pro derivatizaci

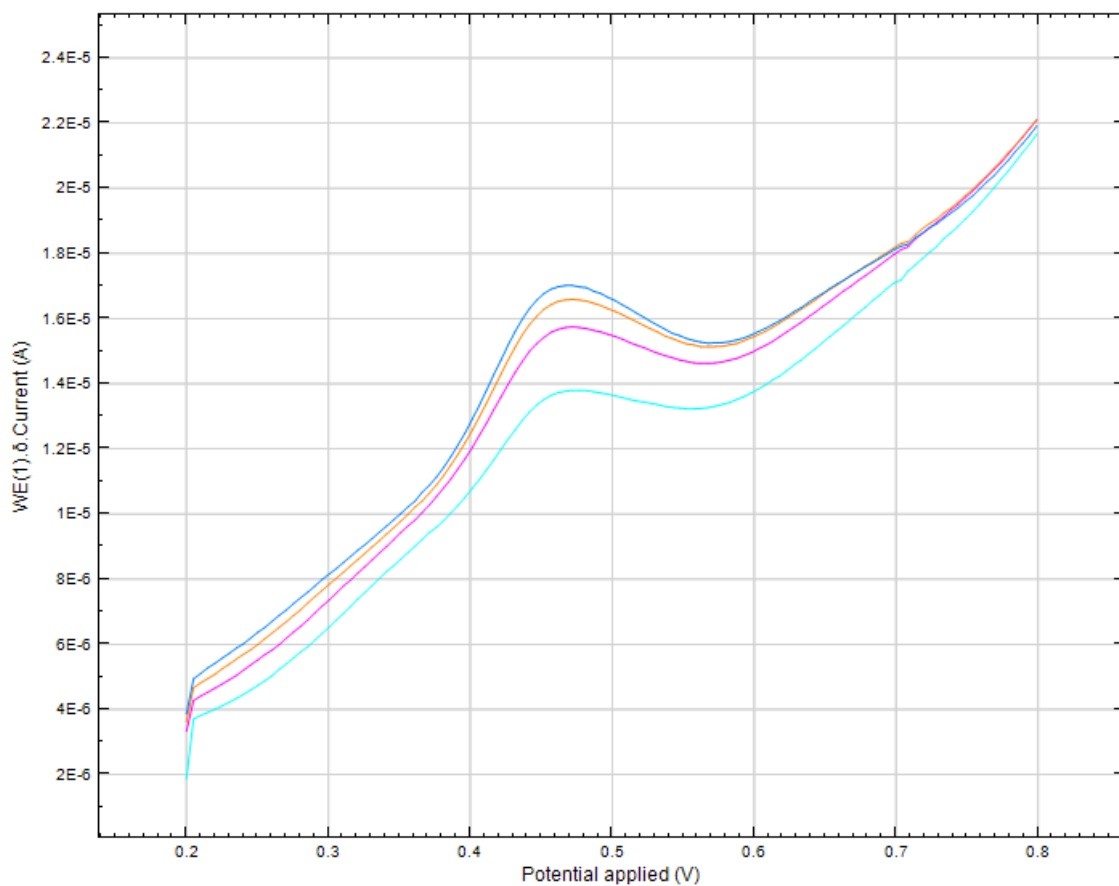
Nejprve bylo měřeno SWV na GCE s elektrolytem LiClO_4 a OPA s přidavkem 0,055mM roztoku citrulinu. Poté bylo postupně přidáváno 1,53-7,06mM roztoku ethanthiolu. Rekční doba pro každý krok byla 6 minut.



Obrázek 36 Graf závislosti proudu na koncentraci ethanthiolu, při měření SWV na GCE v prostředí LiClO_4 s OPA a citrulinem

Z těchto hodnot byla vytvořena křivka s vrcholem při koncentraci 7,1 mM ethanthiolu (obr. 36). Z obr. 36 vyplývá, že optimální koncentrace ethanthiolu pro derivatizaci citrulinu s OPA v elektrolytu LiClO_4 je 7,1 mM.

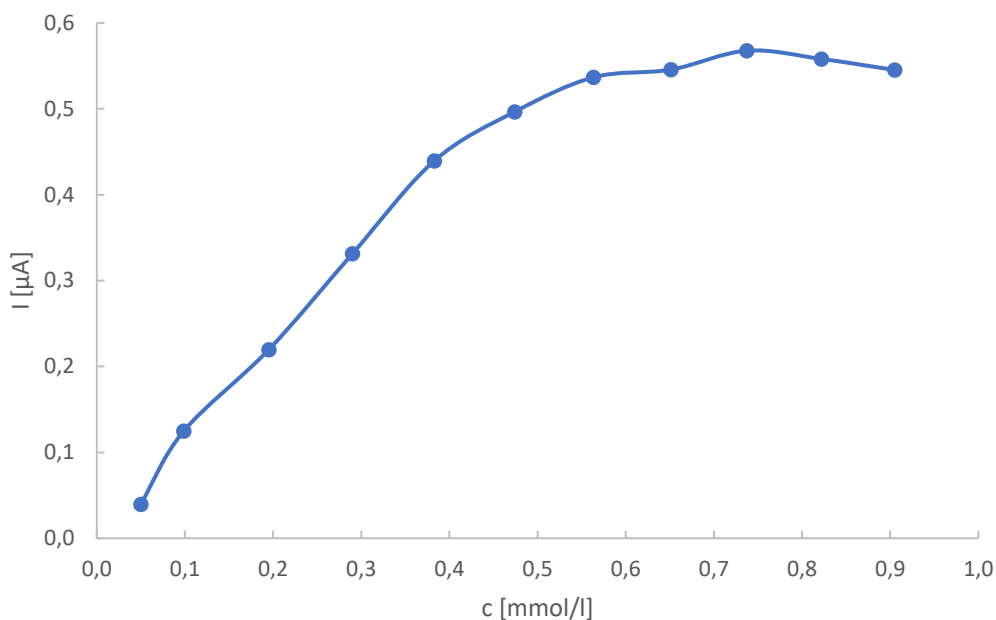
Pro dané měření byly zkoumány i další pracovní elektrody, než GCE, jako CPE a platinová elektroda. Nejvíce vhodnou byla vyhodnocena GCE, jelikož se signál pohyboval ve stejných řádových jednotkách.



Obrázek 37 Ukázkový voltamogram při měření SWV na GCE v prostředí LiClO_4 a OPA-ethanliolu s přidavky a) 0,290mM roztoku citrulinu (světle modrá křivka), b) 0,383mM roztoku citrulinu (růžová křivka), c) 0,474mM roztoku citrulinu (oranžová křivka), d) 0,563mM roztoku citrulinu (modrá křivka), při potenciálovém rozmezí od 0,2 až 0,8 V, potenciálovém kroku 5 mV, amplitudě 50 mV a frekvenci 80 Hz

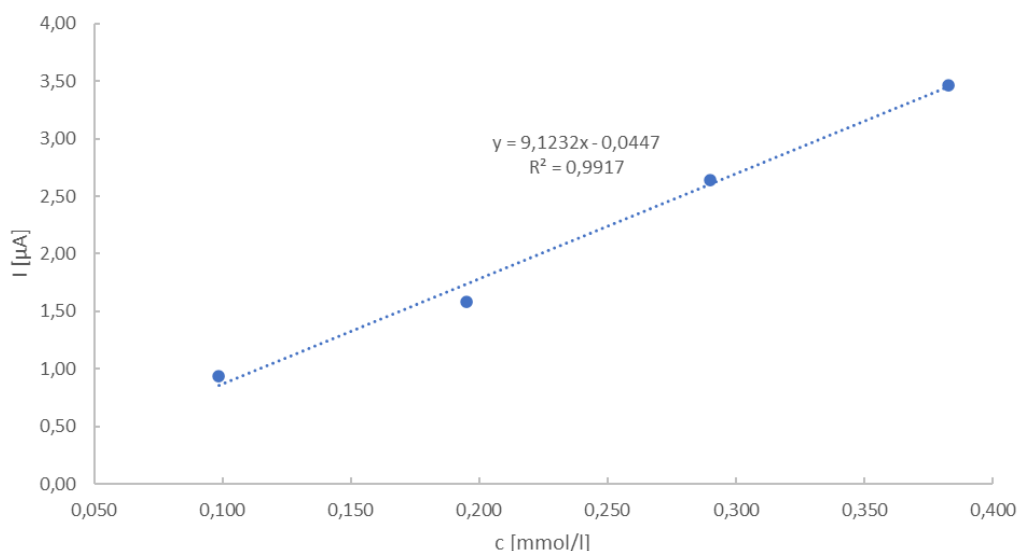
Zjištění nejvyšší možné koncentrace citrulinu

Dále byla zjišťována voltametrická závislost na koncentraci citrulinu. Měření bylo provedeno metodou SWV na GCE s elektrolytem LiClO_4 a OPA s přidavkem 7,1mM roztoku ethanthiolu. Poté bylo postupně přidáváno 1,53-7,06mM roztoku citrulinu (obr. 37). Rekční doba pro každý krok byla 6 minut.



Obrázek 38 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí LiClO_4 a OPA-ethanthiolu

Z dat byla vytvořena křivka s vrcholem při koncentraci 0,737mM roztoku citrulinu (obr. 38). Až do hodnoty 0,383mM roztoku citrulinu je trend křivky lineární, poté se hodnota s přidavkem příliš nemění. Z těchto hodnot byla vytvořena rostoucí čtyřbodová kalibrační křivka citrulinu po derivatizaci s OPA-ethanthiolem (obr. 39).



Obrázek 39 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu při měření SWV na GCE v prostředí LiClO_4 a OPA-ethanthiolu

Stanovení citrulinu metodou kalibrační křivky a vícenásobného standardního přídávku

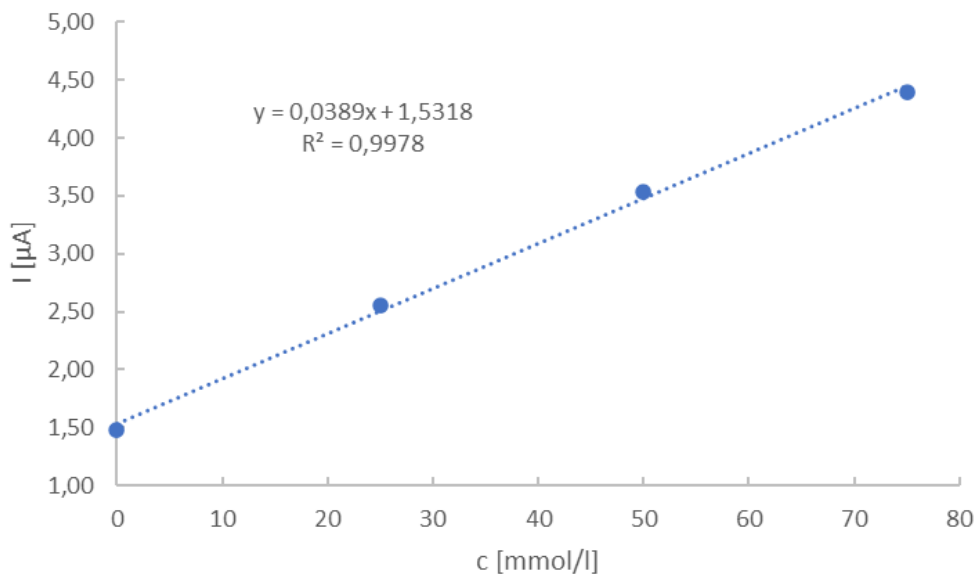
Na základě výše uvedených měření, SWV na GCE v prostředí LiClO_4 s OPA-ethanthiolem, byly provedeny stanovení obsahu citrulinu v reálných a modelových vzorcích, kde byly využity metody kalibrační křivka a vícenásobný standardní přídavek pro dané vzorky.

Tabulka 4 Naměřené hodnoty všech vzorků při derivatizaci OPA-ethanthiolem metodou kalibrační křivky

	Modelový vzorek	Vzorek Citrulline malate	Vzorek Pump
Obsah na obalu	1 750 mg/l	666,66 mg/g	222,22 mg/g
Metoda	Kalibrační křivka [mg/l]	Kalibrační křivka [mg/g]	Kalibrační křivka [mg/g]
OPA-ethanthiol	$1\,724,30 \pm 11,200$	$639,08 \pm 0,117$	$207,62 \pm 0,117$

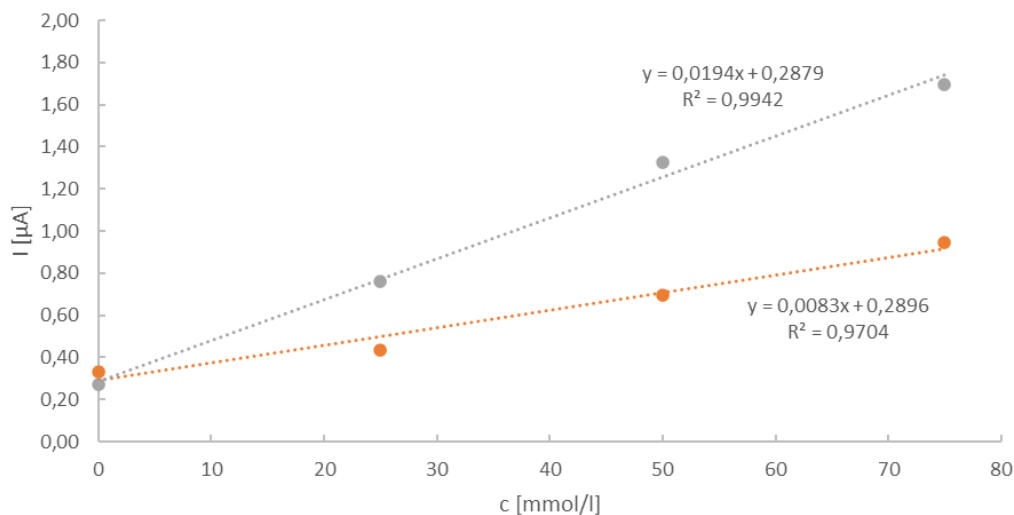
Metodou SWV na GCE v prostředí LiClO_4 s OPA-ethanthiolem bylo stanoveno množství citrulinu v modelovém vzorku metodou kalibrační křivky $1\,724,30 \pm 11,200$ mg/l s výtěžností 98,53 %. Ve vzorku citrulline malate bylo stanoveno množství citrulinu $639,08 \pm 0,117$ mg/g vzorku a ve vzorku pump $207,62 \pm 0,117$ mg/g vzorku.

Křivka vícenásobného standardního přidavku citrulinu pro modelový vzorek měřená v elektrolytu LiClO₄ s OPA-ethanthiolem na GCE metodou SWV (obr. 40).



Obrázek 40 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu pro modelový vzorek při měření SWV na GCE v prostředí LiClO₄ a OPA-ethanthiolu

Křivka vícenásobného standardního přidavku citrulinu pro vzorek citrulline malate (šedá křivka) a vzorek pump (oranžová křivka) měřená v elektrolytu LiClO₄ s OPA-ethanthiolem na GCE metodou SWV (obr. 41).



Obrázek 41 Graf závislosti proudu na koncentraci citrulinu pro vzorek citrulline malate (šedá křivka) a pro vzorek pump (oranžová křivka) při měření SWV na GCE v prostředí LiClO₄ a OPA-ethanthiolu

Tabulka 5 Naměřené hodnoty všech vzorků při derivatizaci OPA-ethanthiolem metodou vícenásobného standardního přídatku

	Modelový vzorek	Vzorek Citrulline malate	Vzorek Pump
Obsah na obalu	1 750 mg/l	666,66 mg/g	222,22 mg/g
Metoda	Vícenásobný standardní přídatok [mg/l]	Vícenásobný standardní přídatok [mg/g]	Vícenásobný standardní přídatok [mg/g]
OPA-ethanthiol	1 722,78 ± 0,314	593,61 ± 0,143	232,61 ± 0,010

Metodou SWV na GCE v prostředí LiClO₄ s OPA-ethanthiolem bylo stanoveno množství citrulinu v modelovém vzorku metodou vícenásobného standardního přídatku 1 722,78 ± 0,314 mg/l s výtěžností 98,44 %. Ve vzorku citrulline malate bylo stanoveno množství citrulinu 593,61 ± 0,143 mg/g vzorku a ve vzorku pump 232,61 ± 0,010 mg/g vzorku s výtěžností. Nalezený vysoký obsah citrulinu může být způsoben tím, že při derivatizaci s OPA-ethanthiolem mohou reagovat i další aminokyseliny a ve vzorku pump je obsažena i aminokyselina taurin, beta-alanin a tyrosin.

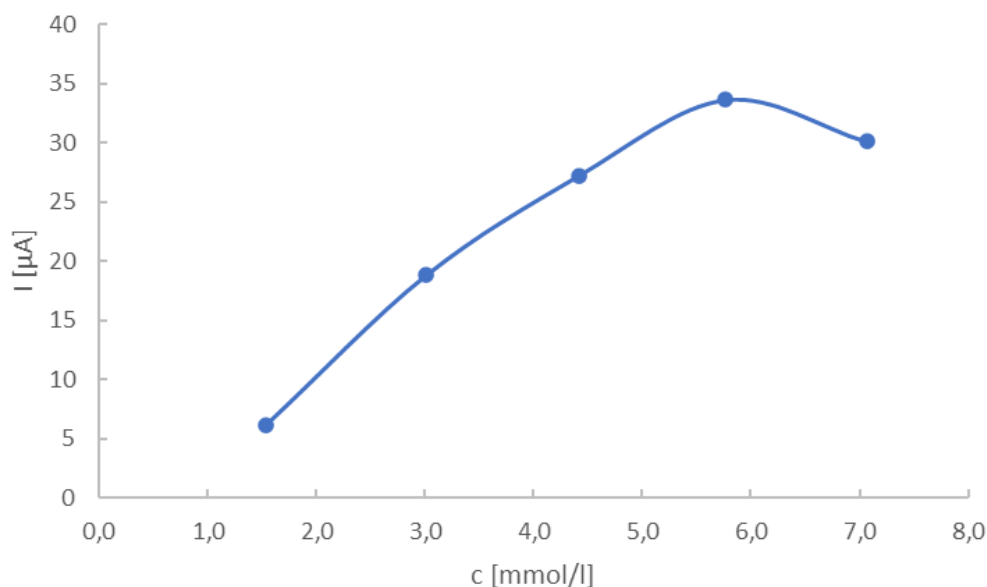
Metodou SWV na GCE v prostředí LiClO₄ s OPA-ethanthiolem bylo naměřeno v modelovém vzorku metodou kalibrační křivky 1 724,30 ± 11,200 mg/l citrulinu s výtěžností 98,53 % a metodou vícenásobného standardního přídatku 1 722,78 ± 0,314 mg/l citrulinu s výtěžností 98,44 %. Ve vzorku citrulline malate bylo stanoveno množství citrulinu metodou kalibrační křivky 639,08 ± 0,117 mg/g vzorku a metodou vícenásobného standardního přídatku 593,61 ± 0,143 mg/g vzorku. Z hodnot uvedených na obalu od firmy Nutrend je obsah citrulinu ve vzorku citrulline malate v poměru 2:1, tedy 666,66 mg/g vzorku. Ve vzorku pump bylo stanoveno množství citrulinu metodou kalibrační křivky 207,62 ± 0,117 mg/g vzorku a metodou vícenásobného standardního přídatku 232,61 ± 0,010 mg/g vzorku. Z hodnot uvedených na obalu od firmy Nutrend je obsah citrulinu ve vzorku pump v poměru 2:1, tedy 222,22 mg/g. Patrný rozdíl obou metod je způsoben přítomností matrice ve vzorku.

4.6.1 Možnosti využití siřičitanu v derivatizační směsi

Dále byla zkoumána derivatizace citrulinu s OPA a siřičitanem. Postupovalo se podle nalezených článků o derivatizaci primárních aminů pomocí siřičitanu sodného od W. A. Jacobs [38].

Zkoumání optimálního množství siřičitanu pro derivatizaci

Nejprve bylo měřeno SWV na GCE s elektrolytem LiClO_4 a OPA s přidavkem 0,055mM roztoku citrulinu. Poté bylo postupně přidáváno 1,54-7,06mM roztoku siřičitanu. Rekční doba pro každý krok byla 4 minuty.



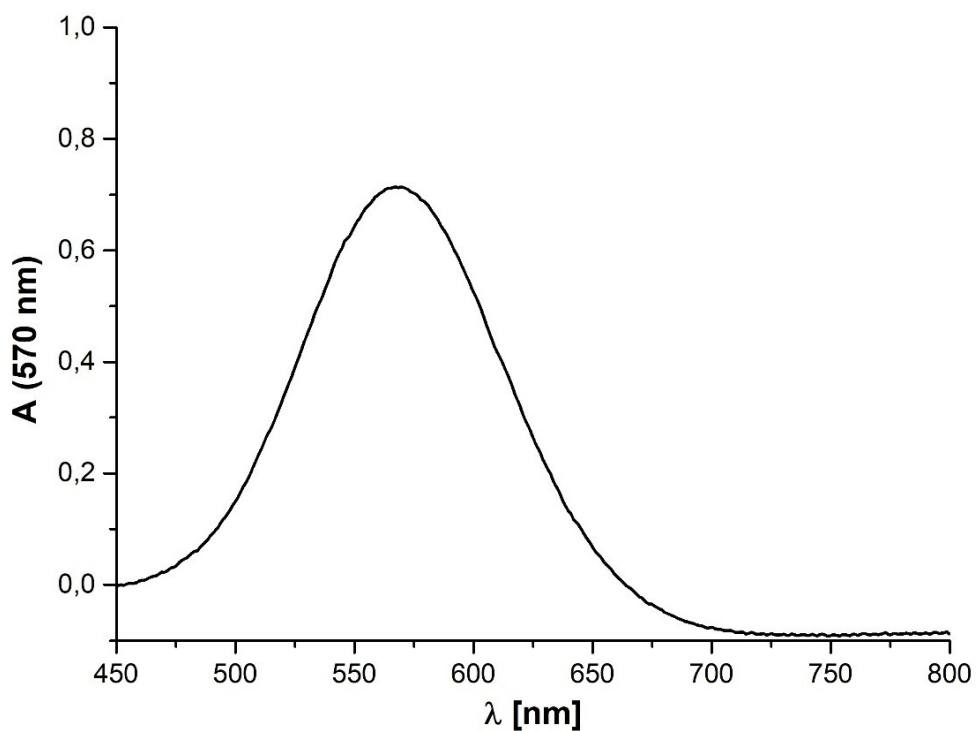
Obrázek 42 Graf závislosti proudu na koncentraci siřičitanu při měření SWV na GCE v prostředí LiClO_4 s OPA a citrulinem

Z těchto hodnot byla vytvořena křivka s vrcholem při koncentraci 5,77 mM siřičitanu (obr. 42). Z obr. 42 vyplývá, že optimální koncentrace siřičitanu pro derivatizaci citrulinu s OPA v elektrolytu LiClO_4 je 5,77 mM. Dále byla zjišťována voltametrická závislost na koncentraci citrulinu, ta ale poskytovala nekonzistentní data.

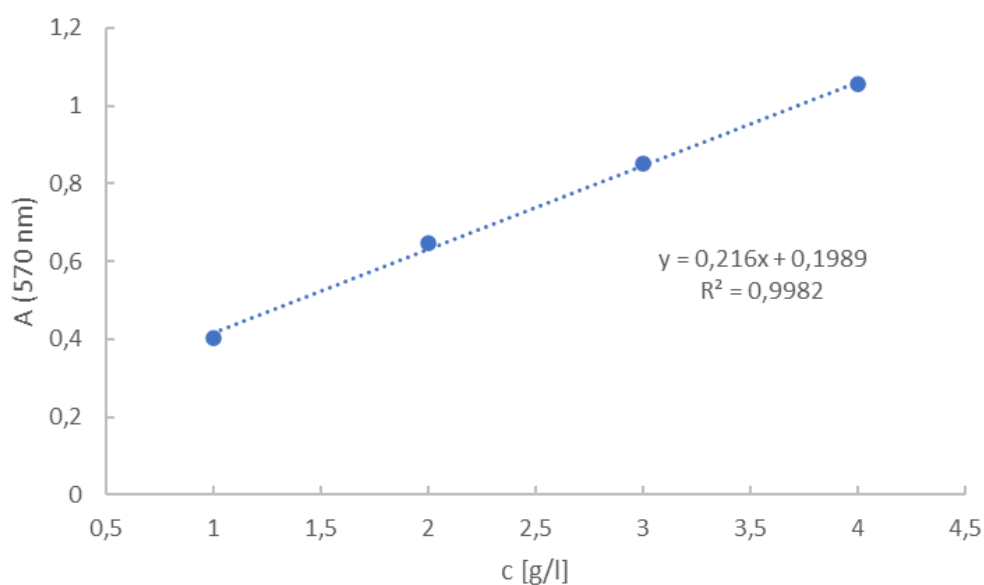
Pro další zkoumání je potřeba změnit podmínky měření. V odborné publikaci o derivatizaci primárních aminů pomocí siřičitanu sodného od W. A. Jacobs používali jako elektrolyt uhličitan sodný, což by mohl být odrazový můstek pro případné další zkoumání u optimalizace této metody.

4.7 Spektrofotometické stanovení citrulinu

Výsledky z voltametrických měření byly porovnávány se spektrofotometrickou metodou. Vycházelo se ze spektrofotometrické metody stanovení prolinu, která se provádí v laboratořích. Absorpční maximum citrulinu je při hodnotě 570 nm (obr. 43). Naměřené absorbance roztoků kalibrační řady byly vyneseny v závislosti na jejich koncentraci (obr. 44). Z rovnice lineární regrese byl vypočítán obsah citrulinu ve vzorcích.



Obrázek 43 UV/VIS spektrum citrulinu



Obrázek 44 Graf závislosti absorbance na koncentraci citrulinu

Tabulka 6 Naměřené hodnoty všech vzorků při spektrofotometrickém stanovení metodou kalibrační křivky

	Modelový vzorek	Vzorek Citrulline malate	Vzorek Pump
Obsah na obalu	1 750 mg/l	666,66 mg/g	222,22 mg/g
Metoda	Kalibrační křivka [mg/l]	Kalibrační křivka [mg/g]	Kalibrační křivka [mg/g]
spektrofotometrie	1 714,68 ± 0,112	693,65 ± 0,319	455,56 ± 0,319

Spektrofotometrickým stanovením citrulinu bylo v modelovém vzorku naměřeno metodou kalibrační křivky $1\,714,68 \pm 0,112$ mg/l citrulinu s výtěžkem 97,98 %. Ve vzorku citrulline malate bylo stanoveno množství citrulinu metodou kalibrační křivky $693,65 \pm 0,319$ mg/g vzorku. Z hodnot uvedených na obalu od firmy Nutrend je obsah citrulinu ve vzorku citrulline malate v poměru 2:1, tedy 666,66 mg/g. Ve vzorku pump bylo stanoveno množství citrulinu metodou kalibrační křivky $455,56 \pm 0,319$ mg/g vzorku. Z hodnot uvedených na obalu od firmy Nutrend je obsah citrulinu ve vzorku pump v poměru 2:1, tedy 222,22 mg/g. Nalezený vysoký obsah citrulinu je způsoben tím, že s ninhydrinem reagují všechny aminokyseliny a ve vzorku pump je obsažena i aminokyselina taurin, beta-alanin a tyrosin.

5 Závěr

Cílem této diplomové práce byla optimalizace elektrochemického stanovení L-citrulinu pomocí voltametrických technik na elektrodách uhlíkového typu. Mezi úvodní měření patřilo ověření, zda lze elektrochemicky sledovat voltametrický signál citrulinu v přítomnosti měďnaté soli, popř. sledovat změny (pokles či nárůst) v odezvě mědi. Vzhledem k tomu, že v literatuře nebyly nalezeny odkazy týkající se voltametrického stanovení této aminokyseliny pomocí tvorby komplexů s kovy, představoval výzkum v této oblasti výzvu. Na začátku stanovení citrulinu v kombinaci s mědí bylo nutné zjistit, jaká je nejvíce vhodná kombinace metod, elektrod a elektrolytů pro toto měření. Na úvod byla vybrána technika diferenční pulsní voltametrie v kombinaci s visící kapkovou rtuťovou elektrodou. Nejvíce vhodná pro svou citlivost a selektivitu byla po provedených měřeních zjištěna square-wave voltametrie (SWV) na elektrodě ze skelného uhlíku (GCE) s elektrolytem Britton-Robinsonova pufru (BRB) o pH 5,63, neboť poskytoval nejnižší pozadí. Na základě měření, SWV na GCE v prostředí BRB o pH 5,63, byly provedeny stanovení obsahu citrulinu v modelových a reálných vzorcích, kde byly využity metody kalibrační křivky a vícenásobného standardního přídatku pro dané vzorky. Značně velký rozdíl obou metod byl způsoben patrně vlivem matrice ve vzorku.

Dále byla testována možnost stanovení citrulinu pomocí derivatizace, kde nebyl kladen důraz na mechanismus s předpokladem, že se citrulin bude chovat stejně jako zkoumané aminokyseliny. Nejdříve byla věnována pozornost derivatizaci citrulinu s OPA-ethanthiolem a následně pak okrajově derivatizaci citrulinu s OPA a siřičitanem. Derivatizace citrulinu s OPA-ethanthiolem poskytovala průkaznější výsledky, ovšem nevýhodou tohoto způsobu derivatizace je zápach ethanthiolu a reakční doba 6 minut.

Výsledky z voltametrických měření byly porovnávány se spektrofotometrickou metodou, kde se výsledky do jisté míry shodovali až na reálný vzorek pump, který obsahoval více druhů aminokyselin, a tudíž dosahoval i vyšších hodnot. Zároveň je nutné poznamenat, že všechny testované metody neposkytují dostatečnou selektivitu a jsou tedy vhodné ke stanovení celkového obsahu aminokyselin ve vzorku.

Seznam literatury

- [1] A. Lapelusa, R. Kaushik, Physiology, Proteins, National Library of Medicine, (2022).
- [2] M. Aftabuddin, Hydrophobic, Hydrophilic, and Charged Amino Acid Networks within Protein, Biophysical Journal. (2008) 225-231.
- [3] T. Řezníková, Vliv příjmu proteinů na vytrvalostní výkon, Univerzita Karlova bakalářská práce, (2022) 10.
- [4] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 9750, Citrulline, (2025).
- [5] T. Allerton, D. Proctor, J. Stephens, T. Dugas, B. Irving, L-Citrulline Supplementation: Impact on Cardiometabolic Health, Nutrients, 10 (2018) 921.
- [6] C. Martínez-Asenjo, M. Pita, A. De Lacey, C. Gutiérrez-Sánchez, E. Lorenzo, New electrochemiluminescent sensing platform based on SnS₂ for direct determination of citrulline, Microchemical Journal, 207 (2024) 111-939.
- [7] B. Havlová, L-citrulin, Kulturistika.com, (2019).
- [8] S. Maric, T. Restin, J. Muff, T. Dugas, S. Holland-Cunz, et al., Citrulline, Biomarker of Enterocyte Functional Mass and Dietary Supplement. Metabolism, Transport and Current Evidence for Clinical Use, Nutrients, 13 (2021) 2794.
- [9] W. Barmore, F. Azad, W. Stone, Physiology, Urea Cycle, (2023).
- [10] S. Cheriyedath, „What is the Urea Cycle?“, News-Medical. (2025).
- [11] Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, Ministerstvo zemědělství, (1997).
- [12] P. Coppens, The Importance of Food Supplements for Public Health and Well-Being, World Rev Nutr Diet, 121 (2020) 66-72.
- [13] Food Supplements, Food Standards Agency, 2018 (2024).
- [14] J. a P. Hlúbik, (2012). Doplnky stravy a jejich možnosti využití u některých degenerativních procesů. Hygiena, 57 (2012) 68-71
- [15] Minerální látky, Ministerstvo zemědělství (2024)
- [16] A. Rimando, P. Perkins-Veazie, Determination of citrulline in watermelon rind, Journal of Chromatography, 1078 (2005) 196-200.
- [17] K. Corleto, J. Singh, G. Jayaprakasha S. Bhimanagouda, Sensitive HPLC-FLD method combined with multivariate analysis for the determination of amino acids in l-citrulline rich vegetables, Journal of Food and Drug Analysis, 27 (2019) 717-728.
- [18] J. Johnson, B. Ohri, K. Walsh, et al., Simple Isocratic HPLC–UV Method for the Simultaneous Determination of Citrulline and Arginine in Australian Cucurbits and Other Fruits, Food Anal. Methods, 15 (2022) 104-114.
- [19] L.J. Salvo, L. Coiana, C. Dobrecky, V. Tripodi, S. Flor, S. Lucangioli, Development and validation of a capillary electrophoresis method applied to the analysis of l-citrulline in an oral formulation for pediatric use, Electrophoresis, 40 (2019) 1719-1721.
- [20] G.K. Jayaprakasha, S Bhimanagouda, A. Patil, Metabolomics approach to identify and quantify the phytochemicals in watermelons by quantitative ¹HNMR, Talanta, 153 (2016) 268-277.
- [21] R.B. Moore, N.J. Kauffman, Simultaneous determination of citrulline and urea using diacetylmonoxime, Analytical Biochemistry, 33 (1970) 263-272.
- [22] Reginald M. Archibald, Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma, Journal of biological chemistry, 156 (1944) 121-142.
- [23] P. Crenn, K. Vahedi, A. Lavergne-Slove, L. Cynober, C. Matuchansky, B. Messing, Plasma citrulline: a marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease, Gastroenterology, 124 (2003) 1210-1219.
- [24] P. Crenn, B. Messing, L. Cynober, Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction, Clinical nutrition, 27 (2008) 328-339.

- [25] C. Bailly-Botuha, V. Colomb, E. Thioulouse, et al., Plasma citrulline concentration reflects enterocyte mass in children with short bowel syndrome, *Pediatric research*, 65 (2009) 559-563.
- [26] V. David, S.C. Moldoveanu, T. Galaon, Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis, *Biomedical Chromatography*, 35 (2021).
- [27] T. Sierra, A.G. Crevillen, A. Escarpa, Derivatization agents for electrochemical detection in amino acid, peptide and protein separations: The hidden electrochemistry?, *Electrophoresis*, 38 (2017) 2695-2703.
- [28] A. Misra, S. a M. Mondal, *o*-Phthalaldehyde: A Versatile Chemical with its Roles and Future Perspectives, *Asian Journal of Organic Chemistry*, 13 (2024).
- [29] K. Sugawara, Y. Yoshizawa, et al., Colorimetric Determination of Citrulline Residues in Proteins, 265 (1998) 92-96.
- [30] Y. Deng, R. Chen, T. Hu, et al., Simultaneous Determination of Arginine and Citrulline in Gourd Fruits and Melons by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection, *Food Anal. Methods*, 10 (2017) 1369–1376.
- [31] R. Lavanya, V. Srinivasadesikan, L. Ming-Chang, V. Padmini, Highly selective detection of citrulline using curcumin analogue and its application in food samples with logic gate behaviour, *Journal of Molecular Structure*, 1288 (2023) 135-771.
- [32] W. Wang, L. Wenjing, L. Zou, G. Li, B. Ye, Novel voltammetric sensor based on poly(l-Citrulline)/SWCNTs composite film modified electrode for sensitive determination of picoside II, *Talanta*, 150 (2016) 346-354.
- [33] H. Li, Y. Shi, Y. Gao, Simple but highly sensitive electropolymerization of L-citrulline and β -cyclodextrin based voltammetric sensor for metribuzin, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 102 (2020) 1784-1792.
- [34] X. Ma, H. Lv, Q. Zhu, M. Chen, Y. Wang, F. Li, Novel sensitive electrochemical method for the detection of ractopamine in meat food via polycitrulline-modified electrode, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37 (2020) 1459-1466.
- [35] Elektrochemický analyzátor, Metrohm.com.
- [36] Stanovení prolinu spektrofotometricky, Laboratoř analýzy přírodních látek (2022).
- [37] S. Farag, J. Klikarová, L. Česlová, K. Vyřas, M. Sýs, Voltametric determination of taurine in energy drinks after *o*-phthalaldehyde-ethanethiol derivatization, *Talanta*, 202 (2019) 486-493.
- [38] W. A. Jacobs, *o*-Phthalaldehyde-sulfite derivatization of primary amines for liquid chromatography-electrochemistry, *Journal of Chromatography*, 392 (1987) 435-441.
- [39] J. Fan, Determination of stability constants of copper(II) complex of glycine in water and alcohol mixed solvents with ion selective electrode technique, *Talanta*, 42 (1995) 317-321.
- [40] D. Kaláb, The relationship between the structure and oscillopolarographic behavior of some amino acids and peptides, *Chemické Zvěsti*, ISSN:0366-6352 (1962).