

# Stanovení folátů v potravinách – vliv způsobu enzymové hydrolýzy

Holasová M., Fiedlerová V.  
VÚPP Praha

## CÍL

Předmětem práce bylo ověření optimálních podmínek, především způsobu enzymové hydrolýzy, při stanovení folátů ve vybraných zeleninových maticích

## ÚVOD

Foláty je obecný název pro mono- a poly- glutamátové deriváty kyseliny listové, které se přirozeně vyskytují v potravinách a jsou biologicky aktivní. Analýza folátů je složitá vzhledem k různým formám přítomným v potravinách, k jejich nízké koncentraci a stabilitě. Pro stanovení folátů se nejčastěji používá mikrobiologická nebo HPLC metoda. Stanovení zahrnuje homogenizaci, extrakci, enzymovou hydrolýzu (uvolnění monoglutamátů z polyglutamátových forem pomocí konjugázy) a vlastní mikrobiologické nebo HPLC stanovení. Vzhledem k tomu, že foláty mohou být vázány na polysacharidy nebo bílkoviny je k uvolnění z potravinové matrice doporučována také aplikace  $\alpha$ -amylázy a proteázy. Je však třeba brát v úvahu malou stabilitu jednotlivých folátů. Vybrané podmínky jsou vždy kompromisem mezi maximální přeměnou polymerů na monomery a minimalizací dalšího štěpení vytvořených monomerů. Použití trienzymové metody nevede vždy k vyšším obsahům folátů ve srovnání s hodnotami získanými při použití pouze konjugázy. Pro každou komoditu je třeba stanovit optimální podmínky analýzy.

Zelenina je ve výživě člověka považována za hlavní zdroj přirozených folátů zajišťující cca 40% denního příjmu. Hodnoty obsahu tohoto faktoru v zelenině jsou tedy podstatné pro hodnocení celkového příjmu folátů. Dominantní složkou folátů v zelenině je 5-methyltetrahydrofolát (5-MTHF), v nízkém nebo stopovém množství byl detekován tetrahydrofolát a 5-formyltetrahydrofolát.

## MATERIÁL A METODY

**Salát ledový, špenát listový, zelí bílé:** zakoupeno v tržní síti

**Osení pšenice, osení ječmen:** VÚZ Kroměříž

**Použité enzymy:**  $\alpha$ -amyláza (EC 3.2.1.1), proteáza (EC 3.4.24.31), konjugáza z vepřových ledvin (EC 3.4.22.12, laboratorní příprava)

**Stanovení 5-methyltetrahydrofolátu:**

### Extrakce

5-10 g vzorku + 40 ml 0,075 M fosfátového pufru pH 6,0 s přidavkem antioxidantů; homogenizace; 10 min/100°C;(dodatečná homogenizace); doplnění na objem 100 ml

### Enzymová hydrolýza

Uvolnění z matrice

A) 5 ml extraktu + 1 ml amylázy (20 mg/ml); inkubace 37°C/3h

B) 5 ml extraktu + 2 ml proteázy (2 mg/ml); inkubace 37°C/3h

C) 5 ml extraktu + 1 ml amylázy; inkubace 37°C/3h + 2 ml proteázy; inkubace 37°C/3h

Dekonjugace

Úprava extraktu na pH 4,9; 5 ml extraktu + 2 ml konjugázy, inkubace 37°C/2h; inaktivace enzymu 5 min / 100 °C; ochlazení; odstředění 10 min / 20 000 rpm, 2 °C

### Čištění pomocí SPE

AccuBond SPE SAX 500 mg; 1 ml dekonjugátu, promytí 6 ml vody; eluce 4 ml 0,1 M octanu sodného s přidavkem 10 % NaCl a 1% kys. askorbové

### HPLC analýza

kolona: Lichrospher® 100 RP 18 (5  $\mu$ m, 250 x 4 mm); předkolona: Lichrospher® 100 RP 18 (5  $\mu$ m, 4 x 4 mm); mobilní fáze: acetonitril: 0,033 M fosfátový pufr pH 2,3 – gradientová eluce (8-18% acetonitrilu); průtok: 1 ml/min.; nástřik: 100  $\mu$ l; detekce: FLD 280/360 nm

### Identifikace a kvantifikace

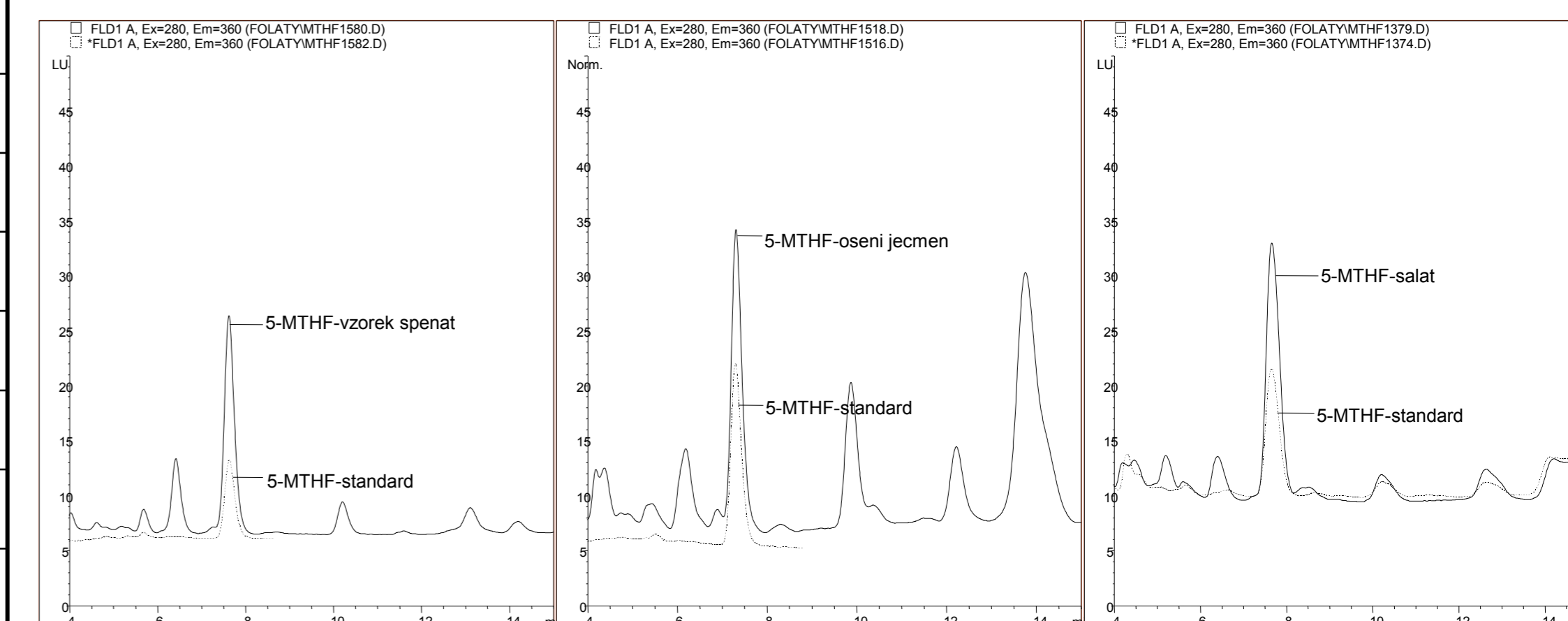
Externí standard 5- MTHF; korekce na čistotu standardu

## VÝSLEDKY

Vliv způsobu použité enzymové hydrolýzy na obsah 5-MTHF				
Vzorek	Obsah 5-MTHF ( $\mu$ g/100g)			
	amyláza + konjugáza	proteáza + konjugáza	amyláza + proteáza + konjugáza	konjugáza
Salát ledový	78,8	72,5	81,3	64,6
Špenát listový	43,8	37,1	34,9	38,5
Zelí bílé	12,3	9,9	9,1	10,0
Osení ječmen	70,7	67,4	67,0	66,4
Osení pšenice	47,0	40,8	39,6	41,0

Vliv počtu homogenizačních kroků na obsah 5-MTHF			
Vzorek	Počet kroků	Obsah 5-MTHF	
		$\mu$ g/100g	%
Osení ječmen č.1	1	21,9	100
Osení ječmen č.1	2	16,7	76
Osení ječmen č.2	1	27,1	100
Osení ječmen č.2	2	22,3	82
Osení ječmen č.3	1	56,6	100
Osení ječmen č.3	2	45,1	80

### Příklady chromatogramů



## ZÁVĚR

- U všech testovaných vzorků vede aplikace amylázy a konjugázy ke zvýšení hodnot obsahu 5-MTHF o 11-22%.
- U vzorku salátu bylo nejvyšších hodnot obsahu 5-MTHF dosaženo při aplikaci trienzymové metody (26 %).
- U vzorků špenátu, zelí a osení byla nejúčinnější aplikace amylázy a konjugázy.
- Použití proteázy nezvyšuje nalezené obsahy u sledovaných matic s výjimkou salátu.
- Zařazení dodatečné homogenizace vzorku po tepelné hydrolýze má za následek pokles obsahu 5-MTHF o 18-24%.
- Metodu pro stanovení folátů zohledňující labilitu folátů a účinnost extrakce je třeba ověřit pro každou matici. Pro stanovení 5- MTHF v salátu je vhodná trienzymová metoda, pro špenát, zelí a osení kombinace amylázy a konjugázy.