

# Optimalizace metody pro stanovení folátů v zelenině a její aplikace



Fiedlerová V., Holasová M., Vavreinová S.

VÚPP Praha

## CÍL

Předmětem práce bylo ověření optimálních podmínek, především způsobu enzymové hydrolyzy, při stanovení folátů a aplikace vypracované metody na vybrané zeleninové zdroje

## ÚVOD

Foláty je obecný název pro mono- a poly- glutamátové deriváty kyseliny listové, které se přirozeně vyskytují v potravinách a jsou biologicky aktivní. Dostatečný příjem folátů snižuje riziko výskytu defektů neurální trubice o novorozenců, kardiovaskulárních chorob a některých forem rakoviny. 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 hydrolyzu (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

**Vzorky zeleniny:** zakoupeny v tržní síti

**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 přísadkou antioxidantů (2-merkapt ethanol, kyselina askorbová); homogenizace na homogenizátoru IKA A11; tepelná hydrolyza 10 min/100°C; doplnění na objem 100 ml

**Enzymová hydrolyza**

úprava pH na 4,9; 5 ml extraktu + 1 ml amylázy (20 mg/1 ml vody) + 2 ml konjugázy; inkubace 37°C/3h; 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 přísadkou 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 (5-18% acetonitrilu); průtok: 1 ml/min.; nástřik: 20  $\mu$ l; detekce: FLD 280/360 nm

**Identifikace a kvantifikace**

externí standard 5- MTHF; korekce na čistotu standardu

Veškeré práce byly prováděny za omezeného přístupu světla a kyslíku.

## VÝSLEDKY

### Vliv aplikace $\alpha$ -amylázy, proteázy a konjugázy na uvolnění folátů z matrice

Na vybraných zeleninových matricích byly vyzkoušeny různé postupy enzymové hydrolyzy a to:

- 5 ml extraktu + 1 ml amylázy (20 mg/ml); inkubace 37°C/3h; úprava extraktu na pH 4,9; 5 ml extraktu + 2 ml konjugázy; inkubace 37°C/2h (A + HK)
- 5 ml extraktu + 2 ml proteázy (2 mg/ml); inkubace 37°C/3h; úprava extraktu na pH 4,9; 5 ml extraktu + 2 ml konjugázy; inkubace 37°C/2h (P + HK)
- 5 ml extraktu + 1 ml amylázy; inkubace 37°C/3h + 2 ml proteázy; inkubace 37°C/3h; úprava extraktu na pH 4,9; 5 ml extraktu + 2 ml konjugázy; inkubace 37°C/2h (A + P + HK)
- 5 ml extraktu + 1-3 ml vody; úprava extraktu na pH 4,9; 5 ml extraktu + 2 ml konjugázy; inkubace 37°C/2h (HK)

vzorek	obsah 5-MTHF							
	a) A + HK		b) P + HK		c) A + P + HK		d) HK	
	$\mu$ g/100g	%	$\mu$ g/100g	%	$\mu$ g/100g	%	$\mu$ g/100g	%
salát ledový	78,8	122,4	72,5	113	81,3	126,0	64,6	100
špenát listový	98,3	112,4	82,3	94,0	85,2	97,4	87,5	100
zelí bílé	12,3	123,0	9,9	99,0	9,1	91,0	10,0	100
zelí čínské	66,1	115,4	61,6	107,5	65,2	113,8	57,3	100
brokolice	56,4	127,0	57,2	128,8	50,1	112,0	44,4	100

### Vliv pořadí, případně současného přidání enzymů na uvolnění folátů z matrice

S cílem minimalizace ztrát folátů v průběhu inkubace vzorku a zkrácení analýzy bylo ověřeno současné působení  $\alpha$ -amylázy a konjugázy. Amyláza je dle literatury používána při pH 6, konjugáza z vepřových ledvin má optimum aktivity při pH 4,9.

- 5 ml extraktu (pH 6)+ 1 ml amylázy (20 mg/ml); inkubace 37°C/3h; úprava extraktu na pH 4,9; 5 ml extraktu + 2 ml konjugázy; inkubace 37°C/2h
- 5 ml extraktu (pH 4,9) + 1 ml amylázy (20 mg/ml); inkubace 37°C/3h, 5 ml extraktu + 2 ml konjugázy; inkubace 37°C/2h
- 5 ml extraktu (pH 4,9) + 1 ml amylázy + 1 ml konjugázy; inkubace 37°C/3h

podmínky hydrolyzy	doba inkubace (h)	obsah 5-MTHF ( $\mu$ g/100g)
e) pH 6,0; A + HK postupně	3+2	74,7 $\pm$ 3,8
f) pH 4,9; A + HK postupně	3+2	72,6 $\pm$ 4,2
g) pH 4,9; A + HK současně	3	78,3 $\pm$ 4,8

### Stanovení obsahu 5-MTHF v zelenině

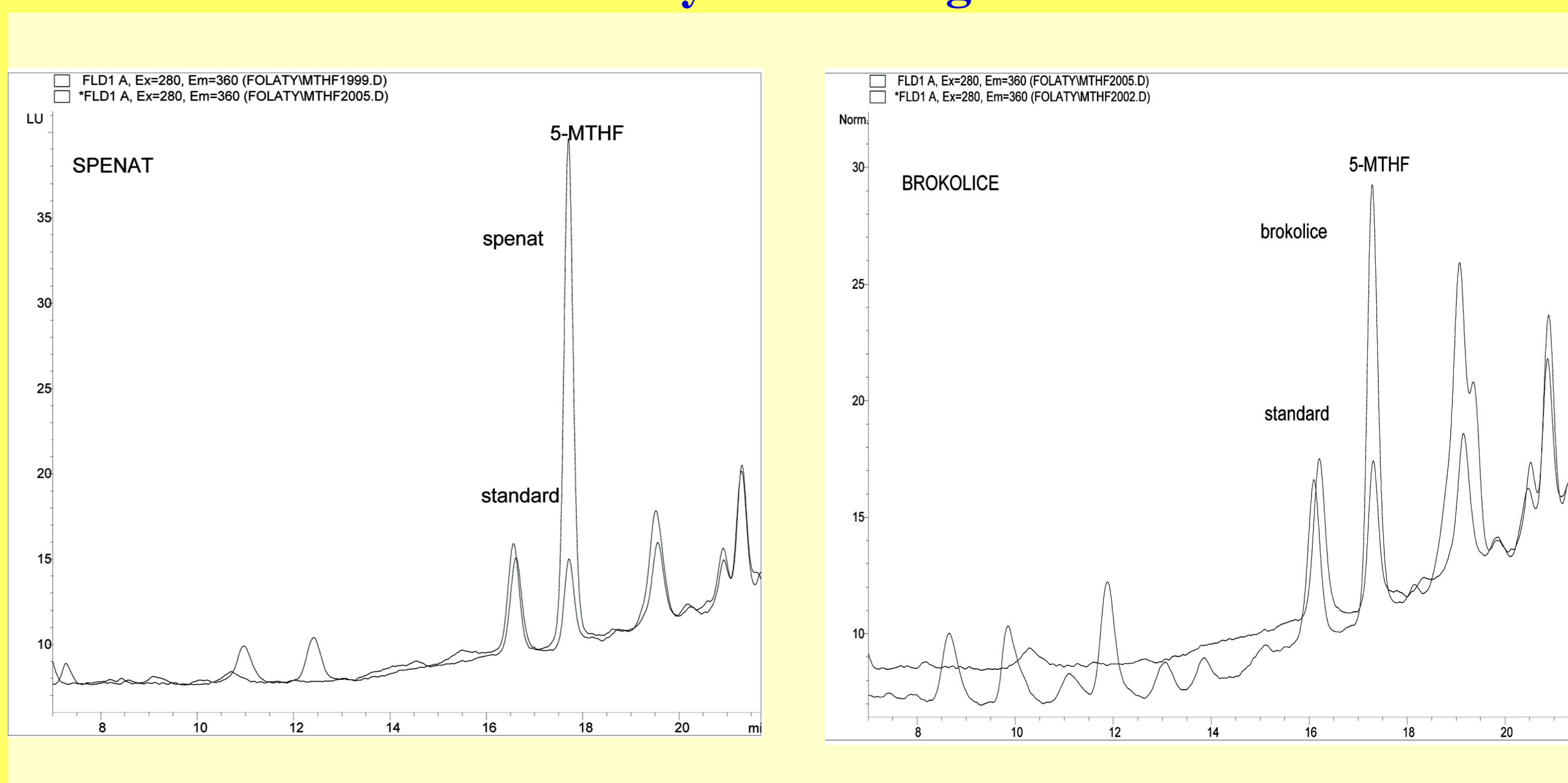
Vypracovaná metoda byla použita ke stanovení 5-MTHF ve vybraných druzích zeleniny a v bramborách. K analýze byly vybrány vzorky, které představují významný zdroj folátů ve stravě a to jak z hlediska vysokého obsahu tak i podílu ve stravě

zelenina	obsah 5-MTHF ( $\mu$ g/100g)	obsah folátů ( $\mu$ g/100g) - lit.a)	obsah 5-MTHF ( $\mu$ g/100g) - lit.b)
brambory	15	16	21
brokolice	56	63	98
cibule - nať	50	14	
květák	89	57	80
mrkev	23	19	16
paprika červená	46	18	50
paprika zelená	17	11	
paprika žlutá	23	26	
petržel kadeřavá	104	152	
pórek	43	64	
růžičková kapusta	50	61	88
salát ledový	73	38	44
špenát listový	87	194	
zelí bílé	16	43	27
zelí čínské	72	79	50

lit.a) U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2005. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnr/nd/>

lit.b) Vahteristo L., Lehtikoinen K., Ollilainen V., Varo P. (1997): Food Chemistry 59,(4),589-597

### Příklady chromatogramů



## ZÁVĚR

❖ Nejvyšší výsledky byly dosaženy při aplikaci  $\alpha$ -amylázy a konjugázy (112,4-127,0 %, průměr 120 % obsahu nalezeného jen s HK). S výjimkou vzorku brokolice byly při použití proteázy a konjugázy nalezené výsledky vždy nižší ve srovnání s aplikací  $\alpha$ -amylázy a konjugázy. Použití trienzymové metody poskytlo vyšší výsledky pouze v případě ledového salátu, rozdíl však je nižší než chyba použité metody. Z porovnání výsledků jednotlivých postupů je patrné, že při použití trienzymové metody nedochází ke kumulaci efektu, pravděpodobně se negativně projevuje dvojnásobná doba inkubace. Jako optimální postup enzymové hydrolyzy pro zeleninovou matrici byla vybrána aplikace  $\alpha$ -amylázy a konjugázy.

❖ Aktivita  $\alpha$ -amylázy je při pH 6 a 4,9 srovnatelná. Při současném přidání  $\alpha$ -amylázy a konjugázy byl dokonce nalezen mírný nárůst hodnot. Důvodem může být minimalizace ztrát snížením doby inkubace.

❖ Špenát, čínské zelí, salát, květák a brokolice mají obsah 5-MTHF nad 50  $\mu$ g/100g, jejich roční spotřeba je podle údajů statistického úřadu v rozmezí 0,9-3,6 kg/osobu. V bramborách bylo nalezeno 15  $\mu$ g 5-MTHF/100g, jejich roční spotřeba však činí 73 kg/osobu. Další méně bohaté zdroje jako je mrkev nebo bílé zelí rovněž mají významný podíl ve spotřebě – 6,5 a 14 kg/os, resp.



Práce byla vypracována v rámci Výzkumného záměru 0002702201.