

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

*По материалам I Международной научно-практической конференции «Биоэлементы». Оренбург, 17–19 июня 2004 г.*

### ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ВЭЖХ ДЛЯ АНАЛИЗА ФИТАТА, И ЕГО ЗНАЧИМОСТЬ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ДЕФИЦИТА ЦИНКА

### VALIDATION OF AN HPLC METHOD FOR PHYTATE AND ITS IMPORTANCE TO DIAGNOSE ZINC DEFICIENCY

**Д. Оберлис, Б.Ф. Харланд**  
**D. Oberleas, B.F. Harland**

Лаборатория пищи и питания. Техасский технологический университет, Лаббок, шт. Техас, США  
Food and Nutrition, Texas Tech University (Emeritus), 3404 88th Street, Lubbock 79423-2706, Texas, USA

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** дефицит цинка, фитат, ВЭЖХ.

**KEY WORDS:** zinc deficiency, phytate, HPLC.

**РЕЗЮМЕ:** Соотношение фитата и цинка в пище в значительной мере обуславливает биологическую доступность цинка для организма. Для сохранения гомеостаза молярное отношение фитата к цинку должно быть не больше 10. Признанным доступным методом для определения фитата является ВЭЖХ. В сочетании со спектрометрическим определением цинка, хроматографический анализ фитата позволяет осуществлять прогнозирование формирования дефицита цинка в индивидуальных и массовых исследованиях.

**ABSTRACT:** Phytate/zinc ratio in food is a significant factor in zinc bioavailability. The phytate/zinc molar ratio should be less than 10 to achieve homeostasis. An HPLC method for the analysis of phytate is available and validated. Being combined with zinc spectrometric assay, the HPLC analysis of phytate allows predicting the zinc deficiency formation for an individual or group of individuals.

Дефицит цинка является преобладающим алиментарным дефицитом во всем мире. Этот факт недостаточно осознается, поскольку лишь немногие клинические симптомы четко выявляют дефицит цинка в организме. Фитат, природный компонент семян растений, играет существенную роль в формировании дефицита цинка. Современные технологии позволяют обследовать популяции людей, особенно детей, с использованием простых неинвазивных методов оценки статуса цинка. С началом

использования микроволновой техники разложения простота и точность анализа цинка методом атомной абсорбции или ИСП бесспорно улучшились.

Признанным доступным методом для анализа фитата является ВЭЖХ. Ион железа образует стабильные окрашенные комплексы с отдельными лигандами, что можно оценить количественно. Сульфосалициловая кислота образует хромофорный комплекс с ионом железа. В более кислых условиях сульфосалициловая кислота высвобождает катион железа, который связывается с лигандами с более высокими константами комплексообразования, например, с фитатом. Условия протекания реакций, участвующих в этом процессе, имеют критическую важность.

Реагенты представляют собой следующие водные растворы: Основной буфер — 0,01 моль/л N-метил-пиперазин- $\text{HNO}_3$ , доведенный 1М  $\text{HNO}_3$  до pH 4. Буфер фильтруют через нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм, при необходимости дегазируют. Буфер стабилен при хранении в стеклянной колбе при комнатной температуре. Для градиентного буфера берут 0,7 моль  $\text{NaNO}_3$  на 1 литр основного буфера. Доводят до pH 4, фильтруют и хранят, как указано выше. Для приготовления реагента Вейда взвешивают 0,2 г (0,74 ммоль)  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  и 1,5 г (6,87 ммоль) 5-сульфосалициловой кислоты. Навеску растворяют в 1 литре  $\text{H}_2\text{O}$ , доводят 1М  $\text{HNO}_3$  до pH 1,8. Реагент чувствителен к свету, но стабилен в течение нескольких месяцев при хранении в колбе из темного стекла при комнатной температуре. Этот

Таблица 1. Результаты определения фитата различными лабораториями в слепых пробах пищевых продуктов методом ВЭЖХ.

Лаборатория	1	2	3	4	5	6	7	8
Образцы	мг/г	мг/г	мг/г	мг/г	мг/г	мг/г	мг/г	мг/г
1 & 12	9,0; 8,3	6,9; 8,5	7,4; 7,0	11,9; 8,9	12,5; 12,1	10,3; 9,8	10,8; 11,0	10,3; 9,8
2 & 9	5,0; 5,5	5,4; 5,2	4,6; 4,9	5,4; 6,8	7,0; 7,0	4,4; 4,0	6,6; 6,0	4,4; 4,0
3 & 14	0,0	2,2; 2,7	0,0	0,0	2,1; 2,1	0,0	2,2; 1,8	0,0
4 & 16	4,1; 6,4	6,2; 5,8	4,4; 4,9	4,6; 4,8	7,2; 7,4	5,4; 5,2	6,9; 7,6	5,4; 5,2
5 & 10	8,1; 8,0	9,9; 9,1	8,2; 9,0	10,5; 8,4	12,6; 12,5	9,4; 8,4	11,2; 11,0	9,4; 8,4
6 & 13	11,4; 11,4	9,7; 10,1	9,9; 9,9	10,5; 12,0	14,2; 14,2	14,3; 14,2	14,4; 13,8	14,3; 14,2
7 & 11	9,1; 8,9	9,2; 9,6	7,0; 6,2	9,2; 10,6	10,5; 10,6	8,9; 8,7	10,9; 10,2	8,9; 8,7
8 & 15	18,7; 17,5	16,9; 16,3	16,4; 15,6	20,4; 18,4	22,0; 22,2	22,5; 22,3	19,9; 19,2	22,5; 22,3

Таблица 2. Содержание фитата в образцах пищевых продуктов по результатам определения методом ВЭЖХ.

Образцы	Содержание фитата, мг/г (M ± m)	Пищевой продукт
1 & 12	9,6 ± 0,44	Детская каша "Gerber" с повышенным содержанием белка
2 & 9	5,4 ± 0,26	Овсяная каша "Gerber" с бананом
3 & 14	0,3 ± 1,20	Рисовая каша "Gerber"
4 & 16	5,7 ± 0,28	Ячменная каша "Gerber"
5 & 10	9,6 ± 0,38	Очищенные пищевые соевые бобы
6 & 13	12,7 ± 0,47	Овсяные отруби "Arrowhead Mills"
7 & 11	9,2 ± 0,32	Мука из шелушенного риса "Arrowhead Mills"
8 & 15	19,6 ± 0,63	Гречневая мука "Arrowhead Mills"

реагент, приготовленный в молярном соотношении сульфосалициловой кислоты к Fe как 9,2:1 имеет максимум поглощения при  $\lambda = 500$  нм. Для извлечения фитата из продуктов питания и кормов в качестве экстрагирующего раствора используют 0,5 или 0,66 М соляную кислоту (HCl). Все образцы экстрактов стабильны в течение 1 месяца при хранении на холоде.

Фитат удаляет ионы железа из комплекса железа с сульфосалициловой кислотой и снижает интенсивность окраски раствора после колонки, соответственно пики находятся в отрицательной области. Большинство компьютерных программ может инвертировать отрицательные пики в положительные. Как можно заметить, разделения эффективны при pH 4, а реакция после колонки проходит при pH 2–2,2.

Стандарты можно приготовить из продажного фитата натрия категории «ч.д.а». «Сертификат анализа» может быть получен у поставщика, либо стандартизация может быть выполнена по анализу фосфата. Опорный стандарт, приготовленный из расчета 10 г/л с 0,5 N HCl, хранится в течение нескольких месяцев на холоде. Для получения калибровочной кривой готовят, по меньшей мере, три разбавления.

Основными компонентами системы ВЭЖХ являются 1) насосная установка, обеспечивающая образование градиента, 2) вспомогательный насос для реагента Вейда для реакции после колонки, 3) УФ детектор, обеспечивающий контроль на длине волны 500 нм и 4) устройство вывода — аналоговый самописец, компьютер или сетевой сервер с соответствующим программным обеспечением. Автоматический дозатор повышает точность ввода проб и обеспечивает автоматизацию анализов. Удобно иметь вакуумный дегазатор, но необходимости в этом нет, так как все реагенты представляют собой водные растворы. Колонка типа PL SAX (5 · 0,46-см, размер гранул 8 мкм, размер пор 100 нм) относится к типу сильных анионообменников (Polymer Laboratories Ltd., UK). Так как в процессе реакции после выхода из колонки образуется осадок, необходим встраиваемый фриттовый фильтр с размером пор 0,5 мкм. Фритты должны быть сменными и использоваться повторно после очистки ультразвуком. Удаление осадка создает нестабильность линии фона, которую можно устранить, используя малообъемный демпфер пульсаций. Скорость потока составляет 1 мл/мин для основного и градиентного буферов и 0,5 мл/мин для реагента Вейда. Объем

образцов может быть 20 мкл в том случае, когда в пробе ожидается значительное количество фитата или 50 мкл для образцов с низким содержанием фитата.

Расчет количества фитата по результатам анализа производится следующим образом:

$\Sigma$  [Содержание фитата<sub>Стандарт</sub> / Площадь пика<sub>Стандарт</sub>] / Количество проб<sub>Стандарт</sub> = К (среднее значение);

Среднее К · R · W · M = мг фитата / г образца, где: Среднее К = среднее количество фитата (нмоль) / ответ (площадь пика) для стандартов;

R<sub>20 или 50 мкл</sub> = ответ образца (Площадь пика<sub>образец</sub>);

W<sub>20мкл</sub> = 500 (5 · 10 · 10 мл экстрагент / масса образца (г)) [поправка на объем и вес образца] (20 мкл · 5 · 10 = 1 мл), и т. д.;

W<sub>50мкл</sub> = 200 (2 · 10 · 10 мл экстрагент / масса образца (г)) [поправка на объем и вес образца] (50 мкл · 2 · 10 = 1 мл), и т. д.;

M<sub>20 и 50 мкл</sub> = 660 (молекулярная масса / 10<sup>6</sup>) [переводит нмоль/г в мг/г].

Молярное отношение является важным параметром при прогнозировании дефицита цинка. Для сохранения гомеостаза молярное соотношение фитат : цинк должно быть меньше, чем 10. Формула следующая:

$$\frac{\text{г/кг фитата}}{660 (\text{мол. масса})} : \frac{\text{г/кг цинка}}{65,4 (\text{ат. масса})} = \text{фитат : цинк (молярное соотношение)}$$

Точность определения цинка является столь же важной, что и точность анализа фитата. Микроволновое озоление выполняется в герметичных тefлоновых «бомбах» при контролируемом давлении либо температуре. Азотная кислота имеет точку кипения 83°C. В тefлоновую «бомбу» помещают 0,5 г образца, добавляют 5 мл воды и 5 мл 70 %-ной азотной

кислоты, и повышают давление до 150 psi (10,5 атм.) в течение 10 мин, затем выдерживают это давление еще 5 мин. Температуру повышают примерно до 160°C. В результате образец полностью растворяется и готов для конечного доведения объема и измерения показаний с использованием методов атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) или спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП). При использовании этих методов необходимо анализировать на фитат и цинк только образцы продуктов питания, и не требуется применять инвазивные методы для прогнозирования дефицита цинка.

Воспроизводимость внутри лабораторий (см. табл. 1) по результатам сравнения парным t-тестом 64 пар данных характеризовалась значением >0,05. Данные о содержании фитата в 8 парах образцов, полученные после объединения результатов из всех лабораторий, приведены в таблице 2. За исключением образца 3, в котором содержание фитата было ниже предела обнаружения для 5-й и 8-й лабораторий, данные свидетельствуют о превосходной согласованности результатов среди лабораторий.

В заключение следует еще раз подчеркнуть, что молярное соотношение фитат : цинк большее, чем 10, по определению создает условия для формирования дефицита цинка, причем данное утверждение верно как для индивидуальных, так и для групповых исследований.

Авторы выражают глубокую признательность коллегам С. Бруксу (Health Canada, Оттава, Канада), С. Дэвидсону (Hill's Pet Nutrition, Топика, США), Л. Хеллеру (USDA Nutrition Laboratory, Итака, США), Э. Лукасу (Ок-лахомский государственный университет, Стиллуотер, США), Э. Мост (Университет Юстуса Либига, Гессен, Германия) и Дж. Смит (Gerber Products Company, Фри-монт, США) за помощь в проведении исследований.