

## **Eine einfache und spezifische Methode zur Bestimmung der Phytinsäure und anderer Inositolphosphate in Lebens- und Futtermitteln**

U. Schlemmer

Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung, Karlsruhe

### **1. Einleitung**

Die Phytinsäure, das *myo*-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogenphosphat (Abb. 1), besitzt für die Human- und für die Tierernährung eine völlig unterschiedliche Bedeutung. Während für die Humanernährung positive Aspekte, wie die antikanzerogene, die antioxidative und die nierensteinverhindernde Wirkung der Phytinsäure, in den Vordergrund des Interesses gerückt sind, konzentriert sich die Tierernährung vor allem auf die Nutzung des Phytat-Phosphors als natürliche Phosphatquelle des Tierfutters (Schlemmer et al., 2009). Beide Disziplinen, wie auch die Futtermittelkunde, haben deshalb ein großes Interesse, Phytinsäure und ihre Abbauprodukte mittels einer genauen, spezifischen und einfachen Methode in Lebens- und Futtermitteln sowie auch in Organen und Körperflüssigkeiten bestimmen zu können.

Wurden bisher vor allem unspezifische Methoden für den Phytinsäurenachweis wie die AOAC-Methode aus dem Jahre 1986 (N.N., 1986) angewandt, so sind in den letzten Jahren eine ganze Reihe von spezifischen HPLC-Methoden entwickelt worden (vergl. Schlemmer et al., 2009), die leider bisher kaum Eingang in die Untersuchungen der Tierernährung oder anderer agrarwissenschaftlicher Bereiche gefunden haben. Zwei Gründe scheinen hierfür ausschlaggebend zu sein. Zum einen ist die ‚alte‘ AOAC-Methode (N.N., 1986) in vielen Labors seit langem etabliert und zum anderen scheint die Befürchtung verbreitet zu sein, wonach eine spezifische Phytinsäureanalyse nur mittels einer sehr aufwendigen HPLC-Analytik durchgeführt werden kann. Die hier vorgestellte HPLC-Methode ist eine einfache und spezifische Methode zur Bestimmung der Phytinsäure und ihrer Abbauprodukte, der Inositolphosphate mit unterschiedlicher Anzahl an Phosphatgruppen sowie der meisten ihrer Stellungsisomere in biologischen Proben. Im Unterschied zur unspezifischen AOAC-Methode (N.N., 1986) kann mit dieser HPLC-Methode der Gehalt an Phytinsäure und anderer Inositolphosphate exakte und spezifisch bestimmt werden.

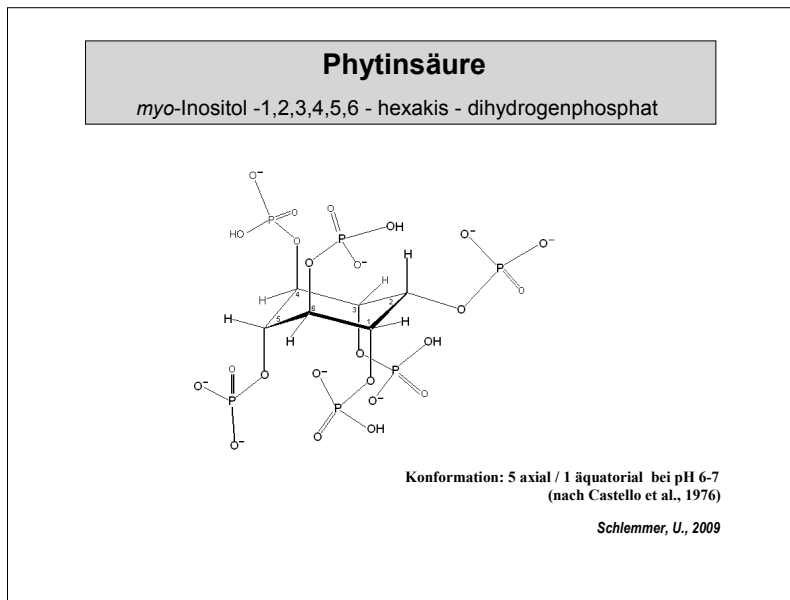


Abb. 1: Strukturformel der Phytinsäure (InsP<sub>6</sub>)

## 2. Methode

### 2.1 Methodenbeschreibung

Die HPLC-Methode basiert auf der Trennung der Phytinsäure und anderer Inositolphosphate an Mono-Q (HR 5/5, 0,5 x 5 cm; Partikeldurchmesser: 10 µm), einem starken Anionenaustauscher (eingehend beschrieben von Mayr (1988)), nach Extraktion mit HCl (0,7 M) oder TCA (0,5 M) aus dem trockenen Probenmahlgut (<1 mm) sowie anschließender Zentrifugation (15 000 x g) und Sterilfiltration. Als Vorsäule für diese säulenchromatographische Trennung dient eine Source-15-Säule (0,5 x 5 cm), die mit dem gleichen Material wie Mono-Q gefüllt ist, das allerdings gröber (15 µm) und daher preiswerter ist, so dass es nach Verbrauch leicht gegen neues Source-15-Material ausgetauscht werden kann. Damit ist Source-15 ein geeignetes und preiswertes Vorsäulenmaterial, das die Mono-Q-Säule wirksam schützt und während der Chromatographie unerwünschte Begleitsubstanzen soweit von den Inositolphosphaten trennt, dass eine exakte und spezifische Inositolphosphat-Bestimmung aus allen biologischen Proben möglich ist. Dieses Verfahren ist effektiv, so dass auf die sonst übliche, sehr aufwendige und fehleranfällige Probenvorreinigung an Dowex

(AG 1 x 8) mit anschließender Einengung in HCl mit steigender Konzentrationen (<6 M HCl), verzichtet werden kann. Die Detektion und quantitative Analyse der Inositolphosphate erfolgt mittels einer Nachsäulen-Derivatisierung mit  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{FeCl}_3$ ) und anschließender Absorptionsmessung bei 290 nm. Diese HPLC-Methode zeichnet sich durch hohe Genauigkeit (CV: <5 %, n = 8), hohe Stabilität (Tag/Tag Reproduzierbarkeit <6,5 %, n = 14) und hohe Empfindlichkeit (Nachweisgrenze (10x): 200 pmol  $\text{InsP}_6$ ,) aus.

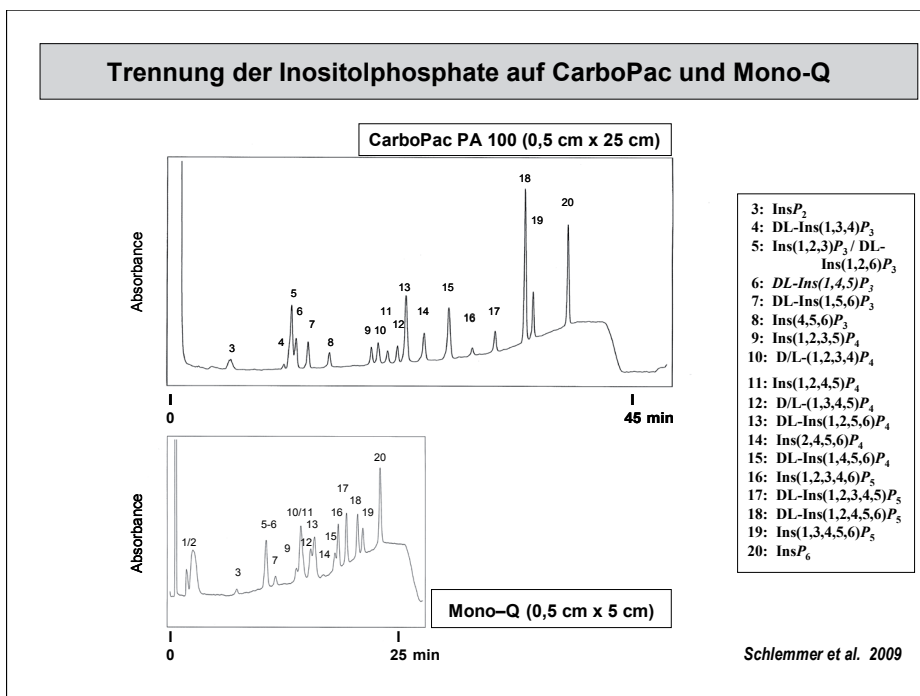


Abb. 2: Vergleich der Trennleistung von starken Anionenaustauschern, wie CarboPac PA 100 und Mono-Q, bei der Trennung von Inositolphosphaten

## 2.2 Methodenvergleich

Es gibt auch andere Anionenaustauscher, wie z. B. CarboPac PA 100, an denen eine gute und zum Teil sogar noch bessere Trennung der Inositolphosphate als an Mono-Q erzielt werden kann. So können vor allem niederphosphorylierte Inositolphosphate, wie  $\text{InsP}_1$  -  $\text{InsP}_4$ , sehr gut an CarboPac PA 100 getrennt werden, die allerdings in unverarbeiteten Lebensmitteln und Futtermitteln keine rele-

vante Rolle spielen, da sie nur in geringsten Spuren auftreten. Der Nachteil dieser Trennung an CarboPac PA 100 ist allerdings, dass der Säulengegendruck mit >350 bar 10 mal höher ist als bei Mono-Q, wodurch sich zahlreiche praktische Probleme ergeben, wie häufiges Verstopfen der Säule, ständige Undichtigkeiten etc., die diese Säule für die Routineanalytik ungeeignet machen. Der Unterschied in der Trennleistung von CarboPac PA 100 (oben) und Mono-Q (unten) ist in Abbildung 2 gezeigt. Abbildung 2 verdeutlicht aber auch, dass die für die Lebensmittel- und Futtermittelanalyse relevanten Inositolphosphate, wie die Phytinsäure ( $\text{InsP}_6$ ) und die Inositolpentaphosphate ( $\text{InsP}_5$ ), präzise und in einer kürzeren Laufzeit an Mono-Q getrennt und bestimmt werden können, so dass aus praktischen Erwägungen die Inositolphosphat-Trennung an Mono-Q vorzuziehen ist.

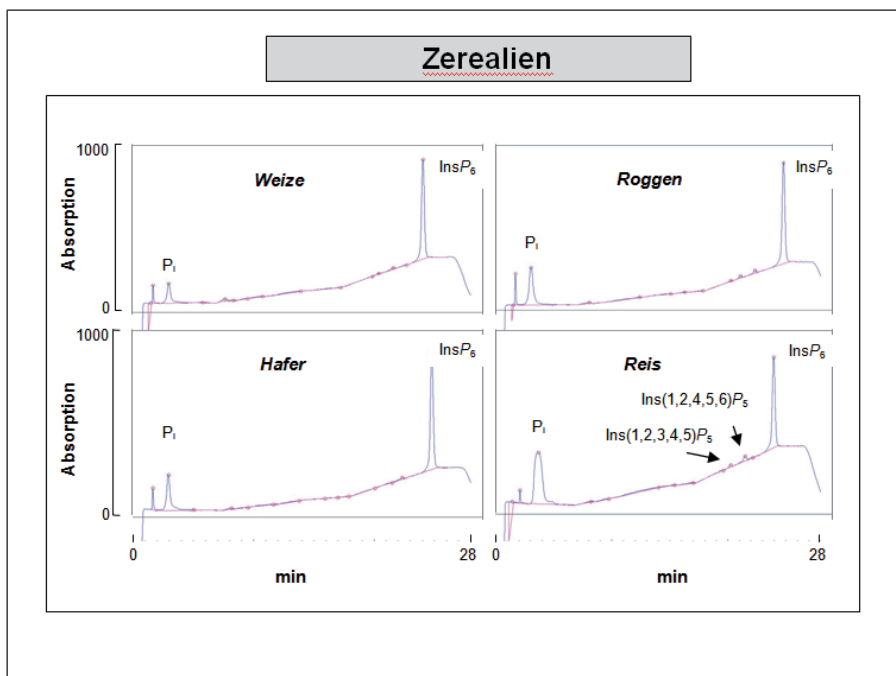


Abb. 3: Inositolphosphate in ausgewählten Zerealien, bestimmt mittels der vorgestellten HPLC-Methode nach Trennung an Mono-Q (HR 5/5; 0,5 x 5 cm)

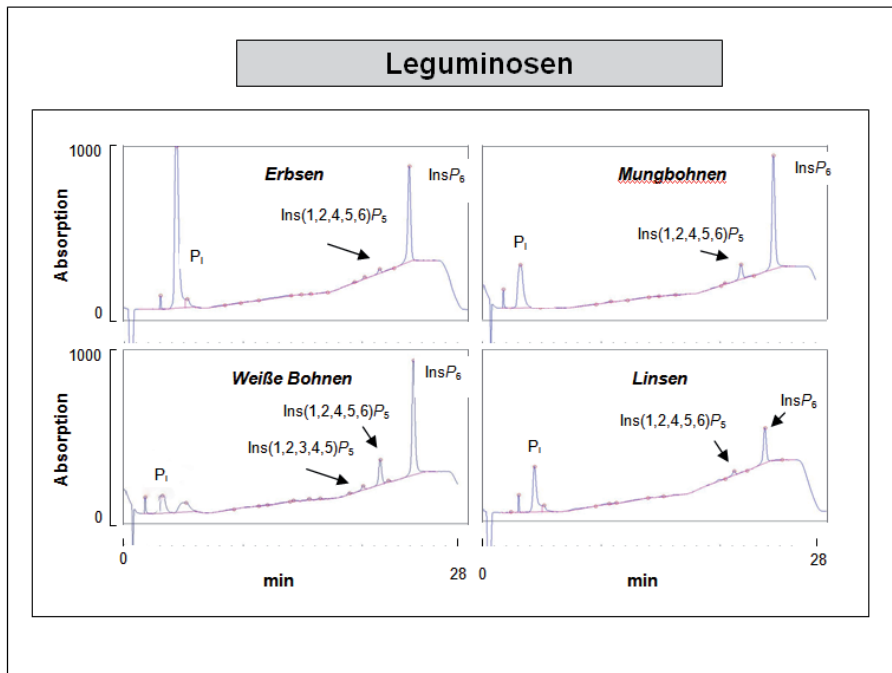


Abb. 4: Inositolphosphate in ausgewählten Leguminosen, bestimmt mittels der vorgestellten HPLC-Methode nach Trennung an Mono-Q (HR 5/5; 0,5x5 cm)

### 2.3 Anwendung der Methode

An ausgewählten Lebensmitteln wurde die HPLC-Methode mit der Inositolphosphat-Trennung an Mono-Q angewendet. Die Analysen zeigen, dass bei unverarbeiteten Zerealien und Leguminosen, neben  $InsP_6$  auch  $InsP_5$  nachgewiesen werden kann (Abb. 3 und Abb. 4), was eine differenzierte Bestimmung der einzelnen Inositolphosphate nötig macht. Während bei Zerealien der Anteil von  $InsP_5$  gering ist (<5 %), liegt er bei Leguminosen deutlicher höherer (~15 %) und kann nicht vernachlässigt werden. Mit einer unspezifischen Phytinsäure-Bestimmung, wie der AOAC-Methode (N.N., 1986), könnte keine Differenzierung der einzelnen Inositolphosphate vorgenommen werden und alle in der Probe enthaltenen Inositolphosphate werden als ‚Phytinsäure-Äquivalente‘, d. h. als Phytinsäure ermittelt, was zu falschen und zu hohen Ergebnissen führt.

Abbildung 5 zeigt, dass mit der HPLC-Methode auch verschimmelte bzw. verdorbene Lebens- und Futtermittel identifiziert werden können, da in den verschimmelten Sojabohnen spezifische Inositolphosphate nachweisbar sind, die durch spezielle Schimmelpilzphytasen aus Phytat gebildet werden.

Ebenso können mit der HPLC-Methode Nahrungsergänzungsmittel auf ihre Inositolphosphat-Zusammensetzung untersucht werden. Da phytinsäurehaltige Nahrungsergänzungsmittel z. B. als ‚IP<sub>6</sub>‘ oder ‚Ca-Mg-Phytin‘ beworben werden, wird suggeriert, dass diese Nahrungsergänzungsmittel vor allem Phytinsäure bzw. ihre Salze enthalten. Die Inositolphosphat-Analyse zeigt allerdings, dass neben InsP<sub>6</sub> große Mengen anderer Inositolphosphate, die Abbauprodukte der Phytinsäure, vorhanden sind. Dadurch stellen diese Präparate keine ‚reinen‘ Phytinsäure- bzw. Phytate-Präparate dar, sondern weisen ein breites Spektrum an unterschiedlichen Inositolphosphaten auf, in dem u. a. auch Phytinsäure bzw. Phytat enthalten ist (Abb. 6).

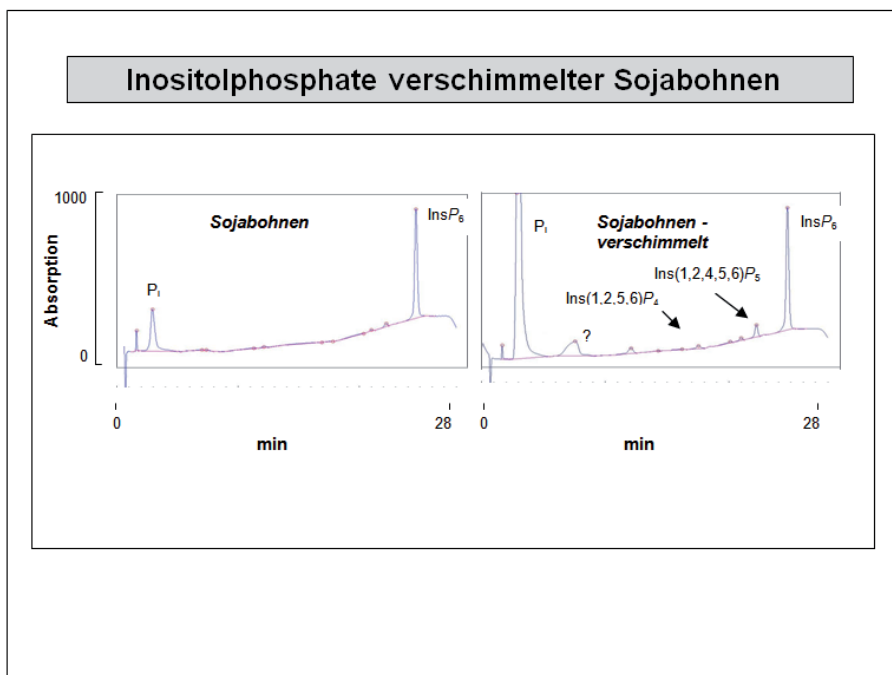


Abb:5: Inositolphosphate in unbelasteten und verschimmelten Sojabohnen, bestimmt mittels der vorgestellten HPLC-Methode und der Trennung an Mono-Q (HR 5/5; 0,5 x 5 cm)

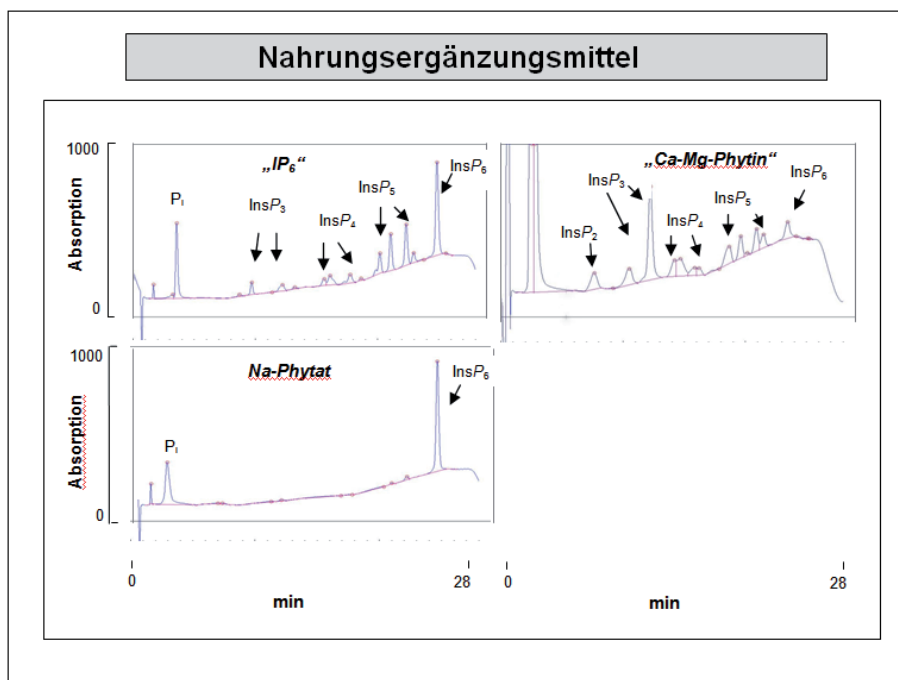


Abb. 6: Inositolphosphate in Nahrungsergänzungsmittel, die als ‚IP<sub>6</sub>‘ oder als ‚Ca-Mg-Phytin‘ beworben werden im Vergleich zu einem Na-Phytat Standard (Reinheit <98%)

### 3. Diskussion und Schlussfolgerung

Die wenigen Anwendungsbeispiele zeigen, dass zur Bestimmung der Phytinsäure und ihrer Abbauprodukte in Lebens- und Futtermitteln heute eine einfache, zuverlässige und spezifische HPLC-Methode unverzichtbar ist und unspezifische Methoden, wie die AOAC-Methode aus dem Jahre 1986 (N.N., 1986) keine Anwendung mehr finden sollten. Die vorgestellte HPLC-Methode ist einfach und spezifisch. Sie zeigt eine hohe Empfindlichkeit, hohe Stabilität und gute Reproduzierbarkeit. Sie ist seit langem erprobt, ist für den Dauereinsatz in der Routineanalyse geeignet und kann in jedem Standardlabor durchgeführt werden.

#### 4. Literatur

- Mayr, G.W., 1988: A novel metal-dye detection system permits picomolar-range h.p.l.c. analysis of inositol phosphates from non-radioactively labelled cell or tissue specimens. *Biochem. J.*, 254, 585-591.
- N.N., 1986: Phytate in Foods – Anion-exchange method, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69, 356-357.
- Schlemmer, U., Frølich, W., Prieto, R.M., Grases, F., 2009: Phytate in foods and significance for humans - food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition and Food Research* 53, (Suppl.), 330-375.