

# Přehled analytických metod pro stanovení fytové kyseliny

## Survey of the Analytical Methods for the Phytic Acid Determination

Karolína BENEŠOVÁ, Sylvie BĚLÁKOVÁ, Renata MIKULÍKOVÁ, Zdeněk SVOBODA

Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Mostecká 7, 614 00 Brno / Research Institute of Brewing and Malting, plc, Mostecká 7, 614 00 Brno

e-mail: benesova@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed paper

**Benešová, K. – Běláková, S. – Mikulíková, R. – Svoboda, Z.: Přehled analytických metod pro stanovení fytové kyseliny.** Kvasny Prum. 59, 2013, č. 5, s. 127–133.

Fytová kyselina je hlavní zásobní forma fosforu v obilných zrnech. Vyskytuje se ve formě smíšených solí (fytátů). Tato forma fosforu je obtížně stravitelná pro monogastriční zvířata i pro člověka. Během průchodu trávicím traktem může fytát vázat některé esenciální stopové prvky a minerály a negativně tak ovlivňuje využitelnost živin a dalších nutričně cenných látek, na druhé straně vykazuje řadu pozitivních zdravotních účinků. Je silným antioxidantem, snižuje riziko řady civilizačních chorob, inhibuje krystalizaci vápníku a brání tvorbě ledvinových kamenů. Má také pozitivní vliv na hladinu glukosy v krvi a cholesterolu. Proto jsou role fytátů v lidské výživě a jeho vliv na zdraví nadále intenzivně studovány. Tato práce shrnuje vývoj analytických postupů pro stanovení fytové kyseliny v obilovinách i dalších matricích od nejstarší metody srážení nerozpustného fytátu železitého v kyselém roztoku, přes kolorimetrické metody až po mnoho druhů moderních instrumentálních metod, jakými jsou například nukleární magnetická rezonance, izotachofóza a vysokoučinná kapalinová chromatografie.

**Benešová, K. – Běláková, S. – Mikulíková, R. – Svoboda, Z.: Survey of the analytical methods for the phytic acid determination.** Kvasny Prum. 59, 2013, No. 5, p. 127–133.

Phytic acid is a main reserve form for phosphorus in cereal grains. It occurs in a form of mixed salts (phytates). This phosphorus form is hardly digestible for monogastric animals and humans. When passing through the digestive tract, phytate can bind some essential trace elements and minerals, thus affecting negatively usability of nutrients and other nutritiously valuable substances; on the other hand, it exhibits a number of positive impacts on health. It is a strong antioxidant; it reduces a risk for many civilization diseases, inhibits calcium crystallization and prevents kidney stones production. It also positively affects a blood glucose level and cholesterol. Therefore, a phytate role in human diet and its effect on health have been studied intensively. This study summarizes the development of analytical methods for the determination of phytic acid in cereals and other matrices from the oldest method of precipitation of insoluble ferric phytate in acid solution and colorimetric methods to many kinds of modern instrumental methods, such as nuclear magnetic resonance, isotachopheris and high-performance liquid chromatography.

**Benešová, K. – Běláková, S. – Mikulíková, R. – Svoboda, Z.: Die Übersicht der analytischen Methoden zur Bestimmung der Phytinsäure.** Kvasny Prum. 59, 2013, Nr. 5, S. 127–133.

Phytinsäure dient als Speicher für Phosphat im Getreidekorn, die in der Form von den gemischten Sälzern (Phytaten) vorkommt. Diese Form ist für die monogastischen Tiere und auch für den Mensch sehr schwer verdaulich. Durch den Durchgang durch Verdauenstrakt kann Phytat einige essentiellen Spurenelementen und Mineralien an sich binden und dadurch auf eine Seite die Verwendbarkeit der Nährstoffe und anderen ernährungsphysiologisch wertvollen Stoffen negativ beeinflussen, auf der anderen Seite viele positive Auswirkungen auf die Gesundheit aufweist. Phytat gibt's als ein starkes Oxidationsmittel, dass das Risiko von vielen Zivilisationskrankheiten reduziert, die Kristallisation von Calcium inhibiert und die Bildung von Nierensteinen vermeidet. Phytat hat auch einen positiven Effekt auf den Glukose- und Cholesterinspiegel im Blut. Das ist der Grund, warum ist die Phytatenrolle in der menschliche Ernährung und seine Wirkung auf die Gesundheit noch weiter intensiv studiert. In dem Artikel wird die Entwicklung von den analytischen Verfahren zur Phytinsäurebestimmung in dem Getreide und in den weiteren Matrizen von den ältesten Methoden des Eisen Phytatniederschlags in sauer Lösung über kolorimetrischen Methoden bis zu den modernen Methoden, zum Beispiel die Kernspinresonanz (NMR), Isotachoforesis und die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zusammengefasst.

**Klíčová slova:** fytová kyselina, fytát, fytasa, analytické stanovení

**Keywords:** phytic acid, phytate, phytase, analytical determination

## 1 ÚVOD

Fytová kyselina byla objevena v letech 1855 až 1856, kdy Hartig poprvé identifikoval malé kulaté částice veliké jako zrna bramborového škrobu, nalezené v semenech různých rostlin (Hartig, 1855; 1856). Použití jodového testu ukázalo, že tyto částice škrob neobsahují, což vedlo k závěru, že musí obsahovat rezervní výživné látky pro klíčení semen. Později bylo zjištěno, že izolované částice jsou bohaté na fosfor, vápník a hořčík, ale neobsahují bílkoviny ani tuky (Pfeffer, 1872). Název fytin (phytin) byl vytvořen na základě skutečnosti, že tato látka je rostlinného původu, nebyla nalezena v mase ani v mléčných výrobcích a byla původně charakterizována jako ložiska vápenato-hořečnatého fytátu v semenech rostlin. Bylo zjištěno, že hydrolyzou fytinu pomocí HCl se uvolní kyselina fosforečná a inositol. O možné struktuře fytové kyseliny se diskutovalo mnoho let a v roce 1914 Anderson (Anderson, 1914) představil molekulární strukturu myoinositol-1,2,3,4,5,6-hexakisdihydrogenfosfátu (IP6), také zvaného fytová kyselina (obr. 1), která byla potvrzena moderními analytickými metodami a platí dodnes. Je to jednoduchý cyklický sacharid se šesti fosfátovými skupinami navázanými na každém atomu uhlíku. Při pH 0,5–9,0 vytváří stericky stabilní strukturu, kdy je konformace fosforečných skupin v uspořádání 5 axiálně a 1 ekvatoriálně (Emsey, Niazi, 1981).

## 1 INTRODUCTION

Phytic acid was discovered in 1855 to 1856 when Hartig first identified small round particles in various plant seeds similar in size to potato starch grains (Hartig, 1855; 1856). The iodine test showed that these particles did not contain starch suggesting that they must contain reserve nutrients for the germination of seeds. Later it was found that the isolated particles were rich in phosphorus, calcium and magnesium but neither contained proteins nor lipids (Pfeffer, 1872). The name "phytin" was created by virtue of the fact that this substance is of plant origin, it has been detected neither in meat nor dairy products, and originally it was characterized as deposits of calcium-magnesium phytate in plant seeds. It was shown that hydrolysing phytin by HCl liberated phosphoric acid and inositol. Possible phytate acid structures were discussed for many years and in 1914 Anderson (Anderson, 1914) introduced the molecular structure of myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphate (IP6), also called phytic acid (Fig. 1), which was confirmed by modern analytical methods and is still valid. It is a simple cyclic saccharide with six phosphate groups bound to each carbon atom. At pH 0.5–9.0 it creates a steric stable structure, conformation of phosphorous groups 5 axial/1 equatorial (Emsey and Niazi, 1981). At physiological pH (6.0–7.0) strong negative molecu-

Při fyziologickém pH (6,0–7,0) jsou silné negativní náboje molekuly vyváženy pravděpodobně sodnými nebo jinými ionty. Tato jedinečná struktura s 12 výměnitelnými protony a vysokou hustotou záporně nabitých fosfátových skupin je zodpovědná za charakteristické vlastnosti umožňující tvorbu velmi stabilních komplexů s polyvalentními kationty.

## 2 VÝSKYT FYTOVÉ KYSELINY

Fytát, sůl fytové kyseliny, je hlavní formou zásobního fosforu v semenech rostlin: představuje 50–85 % fosforu v jádrech obilovin, olejnin a luštěnin (Irvine, 2005). Kromě fytátu jsou v semenech v mnohem menším množství (do 15 %) přítomny i nižší inositolfosfáty, jako inositolpentakisfosfáty a inosoltetrakisfosfáty. Při klíčení semen je fytát enzymaticky hydrolyzován a uvolňuje se fosfát, který je rostlinou spolu s minerály vápníkem a hořčíkem zužitkován při klíčení. Fytát převládá v nepracovaných potravinách, během zpracování je degradován na nižší inositolfosfáty.

Hlavními zdroji fytátu v každodenní stravě jsou obilniny, luštěniny, olejnin a ořechy. Představují 40 až 60 % celkového dietárního příjmu člověka. V obilninách se fytát nachází v aleuronové vrstvě (přibližně 80 %) a klíčku, zatímco v endospermu se téměř nevyskytuje. Obilniny obsahují průměrně 1 % fytové kyseliny v sušině, v rozmezí od 0,06 do 2,2 % (tab. 1). Některé obilné produkty však mají vyšší obsah fytové kyseliny (Wise, 1983), např. v pšeničných klíčcích a pšeničných otrubách se její hladiny pohybovaly od 1,1 do 7,3 %, v rýžových otrubách 2,56–8,7 % (Lehrfeld, 1994). V semenech luštěnin se fytát vyskytuje převážně v proteinových orgánech endospermu nebo dělohy, ve kterých je obsaženo více než 90 % celkového přítomného fytátu. V semenech olejnin se obsah fytové kyseliny pohybuje od 1 do 5,4 % (tab. 2, Wise, 1983). U speciálních potravinářských produktů, jako jsou loupaná sezamová semena, proteinový koncentrát semen řepky olejné nebo sojový koncentrát, byl nalezen fytát v koncentraci až 10,7 %. Vysoká koncentrace fytátu byla nalezena v různých druzích ořechů. Obsahy fytátu ve vybraných potravinách shrnuje tab. 2 (Schlemmer, 2009 a reference citované v tomto článku). Uvedená velká rozpětí koncentrací kyseliny fytové nebo fytátu odrážejí nejen rozdíly botanických odrůd semen, vliv různého životního prostředí a klimatických podmínek pěstování, ale také různá stadia zralosti osiva. Všechny tyto faktory spolu s rozdíly vyplývajícími z použití různých analytických metod ovlivňují stanovení obsahu kyseliny fytové.

## 3 VÝZNAM FYTOVÉ KYSELINY

Fytová kyselina tvoří pevné vazby s řadou důležitých minerálních prvků – hořčíku, draslíku, zinku, vápníku, fosforu a mědi a vytváří tak komplexní, pro organismus velmi obtížně stravitelné směsi. Proto byla dříve považována za antinutriční látku, která negativně ovlivňuje využití těchto prvků u zvířat i lidí. To může být stále problémem v oblastech, kde je vysoký alimentární příjem obilnin a luštěnin spojen s nedostatečným příjmem stopových minerálů, zejména železa a zinku.

Fytová kyselina je jednoznačně antinutriční látkou pouze u některých zvířat. Fylin dokážou beze zbytku strávit pouze přežvýkavci díky mikroorganismům v bachu. Ostatní živočišné, včetně lidí, dokážou strávit fylin pouze částečně. Fytová kyselina je důvodem nízké využitelnosti fosforu obsaženého v obilí, luštěninách a olejninách u prasat a drůbeže. V místech s velkým rozšířením chovů zvířat je špatná stravitelnost fytové kyseliny hlavní příčinou znečištění povrchových vod fosfáty. Problém nízkého využití fytátového fosforu zvířaty je v současné době řešen přidáváním mikrobiální fytasy do krmné směsi (Marounek, 2004) nebo šlechtěním nových odrůd plodin se sníženým obsahem fytové kyseliny a zvýšenou hladinou fosforu nebo s vysokou proenzymovanou fytasovou aktivitou (Vaculová et al., 2012).

Ve výživě lidí přijímajících vyváženou směsí stravu je však přítomnost fytové kyseliny v potravě prospěšná. Hraje významnou roli v prevenci řady civilizačních onemocnění. Je silným antioxidantem, potlačuje tvorbu reaktivních hydroxylových radikálů katalyzovanou železem a rovněž snižuje tvorbu cholesterolu (Graf a Eaton, 1990). Má příznivý vliv na lipidový metabolismus, brání vzniku ledvinových kamenů, používá se jako dietetický doplněk a komplexotvorné činidlo pro odstranění stop iontů těžkých kovů (Marounek, 2004). Fytovou kyselinu v menším množství doprovázejí parciální fosforečné estery myoinositolu. Teoreticky existuje 63 (= 26–1) necyklických a 3 cyklické estery (Velíšek a Hajšlová, 2009). Myoinositol-1,4,5-trisdihydrogenfosfát a myoinositol-1,3,4,5-tetrakisdihydrogenfosfát se např. uplatňují v regulaci intracelulárního obsahu vápníku, myoinositol-1,3,4,5,6-pentakisdihydrogenfosfát moduluje afinitu ke kyslíku, myoinositol-1,2,6-

le charges are most likely counterbalanced by sodium or other ions. This unique structure with 12 replaceable protons and high density of negatively charged phosphate groups provides typical characters enabling formation of very stable complexes with polyvalent cations.

## 2 PHYTIC ACID OCCURRENCE

Phytate, the salt of phytic acid, is a main form of storage phosphorus in plant seeds: it represents 50–85 % of total phosphorus in cereal kernels, oil plants and legumes (Irvine, 2005). Besides phytate, lower inositol phosphates such as inositol pentakisphosphates and inositol tetrakisphosphates are present in seeds to a much lower extent (to 15 %). During germination of seeds, phytate is enzymatically hydrolyzed releasing phosphate which is along with minerals such as calcium and magnesium utilized during germination. Phosphate is predominantly present in unprocessed food, during processing it is degraded to lower inositol phosphate.

The principal phytate sources in the daily diet are cereals, legumes, oil seeds and nuts. They represent 40 to 60 % of total human dietary intake. In cereals, phytate is located in the aleuron layer (approximately 80 %) and germ while the endosperm is almost free of phytate. Cereals contain on average 1 % of phytic acid in the dry matter, ranging from 0.06 to 2.2 % (Tab. 1). Some cereal products, however, have higher phytic acid contents (Wise, 1983), e.g. in wheat germs and wheat brans, phytic acid levels ranged from 1.1 to 7.3 %, in rice brans from 2.56–8.7 % (Lehrfeld, 1994). Phytate in legume seeds predominantly occurs in protein bodies of the endosperm or cotyledon, containing more than 90 % of the total phytate present. In oil seeds the phytic acid content ranges from 1 to 5.4 % (Tab. 2, Wise, 1983). In special food products such as dehulled sesame seeds, protein concentrate of rape seeds or soy concentrate, phytate at concentration of 10.7 % was reported. High phytate concentration was found in various kinds of nuts. Phytate contents in selected foods are summarized in Tab. 2 (Schlemmer, 2009 and references cited in the study). Given variations of phytic acid or phytate concentrations reflect not only differences in botanical varieties of seeds, effect of various environmental or climatic conditions of growing but also different stages of seed maturation. All these factors influence the given phytic acid content, along with differences resulting from various analytical methods.

## 3 SIGNIFICANCE OF PHYTIC ACID

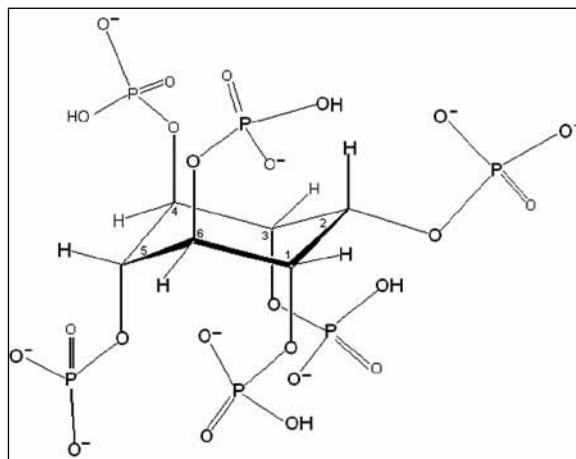
Phytic acid forms bonds with a number of important mineral elements – magnesium, potassium, zinc, calcium, phosphorus and copper, forming thus complex and for the organism very hardly digestible mixtures. Therefore, it used to be regarded as an antinutrient negatively affecting the utilization of these substances in animals as well as humans. This still can be a problem in the areas where a high alimentary intake of cereals and legumes is connected with insufficient intake of trace minerals, namely iron and zinc.

Phytic acid is a complete antinutrient only in some animals. Only ruminants are able to digest phytin completely due to microorganisms in the paunch. Other animals including humans can digest phytin only partly. Phytic acid is a reason of a low usability of phosphorus contained in cereals, legumes and oil-plants in pigs and poultry. Pure digestibility of phytic acid is a main cause of pollution of surface waters with phosphates in the areas with widespread livestock breeding. Today the problem with the low use of phytate phosphorus by animals is solved by addition of microbial phytase to feeding mixtures (Marounek, 2004) or breeding of new varieties of crops with lowered phytic acid content and increased levels of phosphorus or high natural phytase activity (Vaculová et al., 2012).

However, in human diet with balanced mixed nutrition, the presence of phytic acid in food is beneficial. It plays an important role in prevention of many civilization diseases. It is a strong antioxidant; it inhibits iron-catalyzed hydroxyl radical formation and reduces cholesterol (Graf and Eaton, 1990). It affects the lipid metabolism favorably, prevents renal stone formation, it is used as a dietary supplement and complex-creating agent for removing traces of heavy metal ions (Marounek, 2004). To a lower extent, phytic acid is associated with partial phosphorous esters of myo-inositol. Theoretically, 63 (= 26–1) non-cyclic and 3 cyclic esters exist (Velíšek and Hajšlová, 2009). Myo-inositol-1,4,5-trisdihydrogen phosphate and myo-inositol-1,3,4,5-tetrakisdihydrogen phosphate participate in regulation of intracellular content of calcium, myo-inositol-1,3,4,5,6-pentakisdihydrogen phosphate modulates the

-trisdihydrogenfosfát inhibuje srážení krevních destiček a má protizánětlivé účinky (Velišek a Hajšlová, 2009). Nejvýznamnější jsou prokázány protinádorové účinky fytové kyseliny (Shamsuddin, 2002; Vucenik a Shamsuddin, 2006; Jenab a Thompson, 2002; Singh a Agarwal, 2005).

Fytová kyselina má význam i v potravinářství, používá se jako aditivní látka pro čiření vín (zajišťuje odstranění železitých iontů vysrážením fytátu železitého) nebo k prevenci enzymatického i neenzymatického hnědnutí jablečného džusu inhibicí polyfenoloxidasů během výroby a skladování (Du et al., 2012).



Obr. 1 Struktura fytové kyseliny / Fig. 1 Phytic acid structure

affinity to oxygen, myo-inositol-1,2,6-trisdihydrogen phosphate inhibits precipitation of blood platelets and has anti-inflammatory effects (Velišek and Hajšlová, 2009). Proven anticarcinogenic effects of phytic acid are the most important (Shamsuddin, 2002; Vucenik and Shamsuddin, 2006; Jenab and Thompson, 2002; Singh and Agarwal, 2005).

Phytic acid is important in food industry, it is used as a fining agent for clarification of wines (it ensures elimination of ferric ions by precipitation of ferric phytate) or for prevention of enzymatic and non-enzymatic browning in apple juice by the inhibition of polyphenoloxidase during processing and storage (Du et al., 2012).

## 4 FYTASY

Fosfor a další látky vázané ve fytinu mohou být rostlinami i živočichy využity až poté, co je fytin rozložen působením enzymů zvaných souhrnně fytasy. Fytasy postupně katalyzují hydrolyzu fytové kyseliny na meziprodukty myoinositolu (IP6, IP5, IP4, IP3, IP2, IP) a myoinositol. Enzymy schopné hydrolyzy fytátů se vyskytují v mikroorganismech, rostlinách a živočích (Bitar a Reinhold, 1972; Irving a Cosgrove, 1971; Powar a Jagannathan 1967; Nayani a Markakis, 1984). Fytasy se řadí k fosfatasám a dělí se podle toho, kterou fosfátovou skupinu ve fytové kyselině nejprve odštěpí, na 3-ftyasy (EC 3.1.3.8) a 6-ftyasy (EC 3.1.3.26). 3-Fytasy jsou především mikrobiálního, zatímco 6-ftyasy hlavně rostlinného původu. Rostlinné fytasy se vyskytují zejména v obilných zrnech, jejich aktivita je závislá na druhu obilniny. Nejvyšší aktivita fytas byla zjištěna v žitě, nižší potom v pšenici, ovsu a kukuřici (Greiner a Egli, 2003). Fytasy začnou rozkládat fytin, až když nastanou optimální podmínky. Nejdůležitějším požadavkem je vlhkost. Takové podmínky jsou splněny například při klíčení semen. Během výroby sladu se obsah fytátů oproti ječmenu sníží přibližně o 26 % (Hégrová, 2006). Při zpracování potravin, zejména při namáčení, klíčení, sladování, kvašení a výrobě pečiva, jsou přídatky rostlinné nebo mikrobiální fytasy široce používány ke snížení obsahu fytátů v potravinách s cílem zlepšit biologickou dostupnost minerálů a stopových prvků.

## 5 STANOVENÍ FYTOVÉ KYSELINY

### 5.1 Nespecifické metody

Stanovení obsahu fytové kyseliny zahrnuje její extrakci ze vzorku, většinou pomocí kyseliny chlorovodíkové nebo trichloroctové, eventuální přečištění pomocí ionexů a následující analytické stanovení. Základním předpokladem je to, aby byla extrahována či čištěna pouze fytová kyselina, neboť při zpracování potravin dochází k její hydrolyze a rozkladu.

První výzkumy byly nejčastěji založeny na vytvoření sráženiny s trojmocným železem. První obecně přijatá metoda na stanovení kyseliny fytové byla navržena v roce 1914 (Heubner a Stadler, 1914) a byla založena na titraci v přítomnosti thiokyanátu amonného. Bod ekvivalence však nebyl ostrý z důvodu přítomnosti koloidní sráženiny fytátu železitého, která se během titrace tvoří. Casares a Moreno (1951) později tuto metodu modifikovali nahrazením indikátoru salicylátem sodným. Young (1936) vyvinul kolorimetrickou metodu ke stanovení fytové kyseliny založenou na odstranění sráženiny fytátu železitého centrifugací, vhodnou i pro nízká množství fytové kyseliny. Haug a Lantzsche (1983) tuto metodu později urychlili zahříváním vzorku přímo s roztokem trojmocného železa a sledováním poklesu obsahu železa kolorimetricky přidáním thioglykolové (merkaptocetové) kyseliny s 2,2' bipyridinem. Další metody stanovení byly založeny na komplexometrické titraci (Garcia-Villanova et al., 1982). Jednalo se o nepřímé stanovení založené na stechiometrickém poměru železitého iontu a fytátu (Common, 1940; Samotus a Schwimmer, 1962). Harland a Oberleas (1977) zjednodušili srážecí krok a extrahovali kyselinu fytovou přímo s 1,2 % HCl, následovala iontově výměnná chromatografie k oddělení anorganického fosforu s následným vyluhováním koncentrovanou  $H_2SO_4$  a  $HNO_3$ . Stanovený fosfor v potravinách převedli na ekvivalent fytátu. Tato metoda ovšem nerozlišuje mezi různými organickými fosfáty, které mohou být kromě fytátu přítomné ve vzorku (další inositolfosfáty nebo nukleotidy). Proto může být stanovený obsah kyseliny fytové chybně nadhodnocen. Protože však tato metoda byla aplikována především na surové a nezpracované potraviny

## 4 PHYTASES

Phosphorus and other substances bound in phytin can be used by plants and animals only when phytin is degraded by enzymes summarily called phytases. Phytases gradually hydrolyse phytic acid to intermediaries of myo-inositol (IP6, IP5, IP4, IP3, IP2, IP) and myo-inositol. Enzymes capable to hydrolyse phytates occur in microorganisms, plants and animals (Bitar and Reinhold, 1972; Irving and Cosgrove, 1971; Powar and Jagannathan 1967; Nayani and Markakis, 1984). Phytases belong to phosphatases and are classified according to the first cleaved phosphate group, to 3-phytases (EC 3.1.3.8) and 6-phytases (EC 3.1.3.26). 3-phytases are mainly microbial, while 6-phytases are of plant origin. Plant phytases occur mainly in cereal grains, their activity depends on the cereal. The highest phytase activity was detected in rye, lower then in wheat, oats and maize (Greiner and Egli, 2003). Phytases start to degrade phytin only under optimal conditions. The most important prerequisite is humidity. Such conditions are fulfilled for example during seed germination. During malt production, phytate content compared to barley declines by approximately 26 % (Hégrová, 2006). At food processing, mainly steeping, germination, malting and bakery, plant or microbial phytase is widely added to reduce phytate content in foods and improve biological availability of minerals and trace elements.

## 5 DETERMINATION OF PHYTIC ACID

### 5.1 Non-specific methods

Determination of phytic acid includes its extraction from a sample, usually with hydrogen chloride or trichloroacetic, purification with ion-exchange and following analytical determination. The principal prerequisite is that only phytic acid is extracted or purified as during food processing it is hydrolyzed and decomposed.

The first explorations were most frequently based on the formation of a precipitate with iron(III). The first generally accepted method for the determination of phytic acid was proposed in 1914 (Heubner and Stadler, 1914) and was based on a titration in the presence of ammonium thiocyanate. The end-point, however, was not sharp because of the presence of colloidal precipitate of ferric phytate that forms during titration. Casares and Moreno (1951) later modified this method by replacing the indicator with sodium salicylate. Young (1936) developed a colorimetric method for the determination of phytic acid based on the separation of the ferric phytate precipitate by centrifugation which is suitable also for small amounts of phytic acid. Haug and Lantzsche (1983) later accelerated this method by heating the sample directly with the solution of iron(III) and following the decline in iron content colorimetrically adding thioglycolic acid (mercaptoacetic acid) with 2,2' bipyridine. Other methods were based on complexometric titration (Garcia-Villanova et al., 1982). This indirect measurement was based on a stechiometric relationship between ferric ion and phytate (Common, 1940; Samotus and Schwimmer, 1962). Harland and Oberleas (1977) simplified the precipitation step and extracted phytic acid directly with 1.2 % HCl, followed with ion-exchange chromatography to separate inorganic phosphorus, then subsequently digesting it with concentrated  $H_2SO_4$  and  $HNO_3$ . Phosphorus measured in foods was converted to phytate equivalent. This method, however, does not distinguish different organic phosphates which can be present in the sample in addition to phytate (other inositol phosphates or nucleotides). Therefore, the phytic acid content



s nízkým obsahem (do 15 %) nižších fosforylovaných inositolfosfátů (IP1 – IP5) (Dorsch et al., 2003), byla tato chyba prakticky nevýznamná. Uvedený postup se stal základem pro vývoj AOAC (Association of Analytical Communities) metody č. 986.11 pro určení obsahu fytátu v potravinách (AOAC, 1986). Další nespecifické metody jsou shrnuty v rozsáhlých review (Oberleas et al., 1986; Xu et al., 1992).

V roce 1980 Latta a Eskin vyvinuli rychlou a jednoduchou kolorimetrickou metodu na stanovení fytátu, založenou na reakci železitého iontu a sulfosalicylové kyseliny (Wadeovo činidlo). Výše uvedené metody jsou však nevhodnější pro nezpracované potraviny s vysokým obsahem fytové kyseliny ve formě IP6, neboť jej nelze oddělit od nižších substituovaných inositolfosfátů. Tyto metody jsou také časově náročné, vyžadují pečlivé sledování, aby se minimalizovaly ztráty, a nelze jimi oddělit další interferující látky, které mohou komplikovat stanovení.

Pro stanovení ve zpracovaných potravinách s vysokým obsahem produktů hydrolýzy fytátu (nižších inositolfosfátů) nebo pro stanovení v biologických vzorcích (krevní plasma, moč, tkáň a pletiva) jsou tyto metody nedostatečné a nepřesné. Pro oddělení fytové kyseliny od nižších inositolfosfátů a dalších látek přítomných zejména v komplexních maticích bylo nutné vyvinout modernější, citlivější metody, které umožňují stanovení těchto látek i ve stopových koncentracích.

## 5.2 Chromatografické metody

Metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) mají citlivost a reprodukovatelnost potřebnou k měření nízkých koncentrací v různých produktech, takže jsou vhodné pro kvantifikaci fytové kyseliny i ve zpracovaných potravinách. Mohou současně oddělit a určit IP6 a nižší fosforylované deriváty za současného zkrácení extrakce a zakonzentrování. S různými modifikacemi pro kolony, mobilní fáze, průtoky, extrakční rozpouštědla a techniky přípravy se HPLC stala standardní metodou pro rutinní analýzy kyseliny fytové. Nevýhodou je, že tyto metody jsou drahé a vyžadují značné investice do vybavení laboratoře.

V roce 1952 Smith a Clark jako první rozdělili fytovou kyselinu a další inositolfosfáty z půdy pomocí iontově-výměnné chromatografie. Jako mobilní fáze byl použit gradient HCl. V roce 1980 stanovil Tangendjaja et al. obsah fytové kyseliny v rýži kapalinovou chromatografií na reverzní fázi na koloně  $\mu$ Bondapak C18 s pomocí 5 mM octanu sodného jako mobilní fáze. Graf a Dintzis (1982) postup zdokonalili, před touto separací přidali přečištění vzorku pomocí iontově-výměnné chromatografie a pro detekci fytové kyseliny použili detektor indexu lomu (RI detekci). Uvedený postup úpravy a zakonzentrování vzorku se ukázal být velmi užitečným pro dobrou separaci a detekci inositolfosfátů metodami HPLC, zejména v komplexní matici, a byl velmi často používán. Vzhledem k nízké retenci fytové kyseliny (1,4 min) na koloně  $\mu$ Bondapak C18 mohly být další inositol fosfáty diskriminovány. Sandberg a Ahderinne (1986) rozdělili inositolfosfáty s různými počty fosfátových skupin (IP3-IP6) na stacionární fázi C18 s použitím octové kyseliny, methanolu a tetrabutylamoniumhydroxidu jako ion-párového činidla v mobilní fázi. Většina inositolfosfátů včetně jejich stereoisomerů byla rozdělena na silné anexové koloně MonoQ-column s použitím gradientu HCl (Mayr, 1988). Nevýhodou byl poměrně dlouhý čas analýzy (60–90 minut). Dobrého rozdělení inositol fosfátů (IP3-IP6) bylo dosaženo také na krátké koloně Mono-Q HR 5/5 (5x50 mm) za méně než 30 minut (Schlemmer et al., 2001). Tato metoda je dostačující pro většinu analýz fytové kyseliny v potravinářských a biologických vzorcích.

Použití spektrofotometrické detekce je vždy problematické, neboť fytová kyselina nemá charakteristické absorpční spektrum v ultrafialové a viditelné oblasti (UV-VIS). Proto se provádí nepřímá detekce, založená na stechiometrické reakci výměny kovu z barevného komplexu. Vysoká afinita fosfátových skupin inositol fosfátů k polyvalentním kationtům, jako např.  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$ , je základem nejčastěji používaných metod pro UV- VIS detekci fytátu a inositolfosfátů. Absorpce může být měřena buď přímou interakcí mezi kationty, například  $\text{Fe}^{3+}$ -ionty a inositol fosfáty (Phillippy, 2003), nebo prostřednictvím reakcí výměny ligandu, např. odstraněním kationtu z intenzivně barevného komplexu s inositolfosfáty, což vede k zesvětlení tohoto komplexu (Mayr, 1988). Metody poskytují spolehlivou detekci inositolfosfátů, nicméně tímto způsobem lze stanovit také jiné organické fosfáty, například nukleotidy, které během chromatografické separace mohou koeluvovat s některými izomery nižších inositol fosfátů (IP1-IP3) a komplikovat tak stanovení. V případě analýzy potravinářských vzorků je tento vliv nízký, ale v případě analýzy buněk, tkání, krevní plasmy a dalších biologických vzorků musí být přítomné nukleotidy a další fosforylované proteiny odděleny již při přípravě vzorků, např. přidáním iontově-výměnnou chromatografií nebo úpravou pomocí aktivního uhlí.

V roce 2006 Dost a Tokul navrhli HPLC metodu založenou na reakci výměny kovu z barevného komplexu  $\text{Fe(III)}$  thiokyanátu. Mayr

found may be falsely overestimated. Nevertheless, as this method was applied mainly to raw and unprocessed foods with low contents of (to 15 %) of lower phosphorylated inositol phosphates (IP1 – IP5) (Dorsch et al., 2003), this error was insignificant. The method described above became for developing an AOAC (Association of Analytical Communities) method no. 986.11 for the determination of phytate content in foods (AOAC, 1986). Further non-specific methods are summarized in extensive reviews (Oberleas et al., 1986; Xu et al., 1992).

In 1980 Latta and Eskin developed a fast and simple colorimetric method for the determination of phytate based on reaction of ferric ion and sulphosalicylic acid (Wade's reagent). The above mentioned methods, however, are suitable for unprocessed foods with high contents of phytic acid in IP6 form as it cannot be separated from lower substituted inositol phosphates. These methods are also time demanding; they require careful following to minimize losses and do not separate other interfering substances which may complicate the measurement.

These methods are insufficient and inaccurate for the measurement in processed foodstuffs with high content of phytate hydrolytic products (lower inositol phosphates) or for the determination in biological samples (blood plasma, urine, tissues). For the separation of phytic acid from lower inositol phosphates and other substances present mainly in complex matrices, modern, more sensitive methods enabling determination of these substances even in trace amounts had to be developed.

## 5.2 Chromatographic methods

High-performance liquid chromatography methods (HPLC) exhibit sensitivity and reproducibility needed for the measurement in various products, this makes them suitable to quantify phytic acid contents in processed foodstuffs as well. They can simultaneously separate and determine IP6 and the lower phosphorylated derivatives, extraction and concentration procedures are shortened. HPLC methods with various modifications for columns, mobile phases, flow rates, extraction solvents, and preparation techniques have become the standard routine analysis for phytic acid. Their disadvantage is that they are expensive and require investment into laboratory instrumentation.

In 1952 Smith and Clark were the first to separate phytic acid and other inositol phosphates from soil using anion-exchange chromatography. HCl gradient was used as mobile phase. In 1980 Tangendjaja et al. determined phytic acid content in rice using reverse phase liquid chromatography on the column  $\mu$ Bondapak C18 using 5 mM of sodium acetate as mobile phase. Graf and Dintzis (1982) improved the technique, before separation, the sample was purified by ion-exchange chromatography and the refractive index detector (RI detection) was used to detect phytic acid. This technique for sample preparation and concentration proved to be very helpful for a good separation and detection of inositol phosphates by HPLC methods, mainly in complex matrix, and was widely used. Due to the low retention of phytic acid (1.4 min) on  $\mu$ Bondapak C18 columns, other inositol phosphates could be discriminated. Sandberg and Ahderinne (1986) separated inositol phosphates with different numbers of phosphate groups (IP3-IP6) on the stationary phase C18 using acetic acid, methanol, and tetrabutyl ammonium hydroxide as ion-pair reagents in mobile phase. Most inositol phosphates including their stereoisomers were separated on a strong anion-exchange Mono-Q column using HCl gradient (Mayr, 1988). The disadvantage was a long running time needed for the analyses (60–90 minutes). A good separation of inositol phosphates (IP3-IP6) was also achieved on a short Mono-Q HR 5/5 (5x50 mm) column in less than 30 minutes (Schlemmer et al., 2001). This method is adequate for most analyses of phytic acid in food and biological samples.

The use of spectrophotometric detection is always problematic as phytic acid has not characteristic ultraviolet and visible absorption spectrum (UV-VIS). Therefore indirect detection based on stoichiometric metal replacement reaction from a coloured complex is performed. High affinity of phosphate groups of inositol phosphates to polyvalent cations such as  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  is the basis of the most frequently used methods for the UV- VIS detection of phytate and inositol phosphate. Absorption can be measured either by direct interaction between cations, eg  $\text{Fe}^{3+}$ -ions and inositol phosphates (Phillippy, 2003), or by ligand exchange reactions, for example by removing cation from the intensive-ly colored complex by inositol phosphates which results in bleaching of the complex (Mayr, 1988). The method provides a reliable detection of inositol phosphates; it can also be used for the determination of other organic phosphates such as nucleotides which during chromatographic separation may coelute with some isomers of lower inositol phosphates (IP1-IP3) complicating thus the determination. This effect is low in the analysis of food samples, however, when cells, tissues, blood plasma and other biological samples are analysed, nucleotides and other phosphorylated proteins need to be separated by sample preparation, eg by additional anion-exchange chromatography or charcoal treatment.

(1988) použil k detekci inositol fosfátů barevného komplexu Ytria a 4-(2-Pyridylazo)resorcinolu (PAR). Yttrium-PAR komplex v přítomnosti inositol fosfátů zesvětluje, vzhledem k vyšší afinitě  $Y^{3+}$  iontů na jejich fosfátové skupiny. Absorbance je měřena při 546 nm jako negativní pik. Jde o dosud nejcitlivější detekci isomerů inositol fosfátů (pmol). Lze také použít postkolonové derivatizace (Phillippy a Johnston, 1985; Imanari et al., 1982; Cilliers a Niekerk, 1986).

Reakce na principu výměny ligandu byla uplatněna i u fluorescenční detekce inositolfosfátů, kde Irth (1990) odstranil  $Fe^{3+}$  ionty z komplexu  $Fe^{3+}$  a 4-methylkumarin-6-methyliminodiacetové kyseliny s inositolfosfáty, čímž dojde k oslabení zhášení fluorescence v přítomnosti  $Fe^{3+}$  iontů a v závislosti na koncentraci inositolfosfátů se intenzita fluorescence zvýší. March (1999) použil metodu, založenou na aktivaci oxidace 2,2'-bipyridyl ketonu hydrazonu katalyzovanou  $Cu^{2+}$  ionty vedoucí ke vzniku vysoce fluoreskujících produktů, ke stanovení fytoátů v moči.

K detekci fytové kyseliny po HPLC separaci byla použita také detekce rozptylu světla (Phillippy et al., 2003), která byla méně citlivá, a vodivostní detekce, která je schopná s vysokou citlivostí detekovat i nižší inositolfosfáty (Talamond et al., 2000).

HPLC s hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC/MS) byla rovněž použita pro stanovení fytoátů v lidské moči (Perello et al., 2004). Metoda je založena na hydrolyze fytoátů a stanovení myoinositolu po přečištění na anexové chromatografii. K separaci byla použita kolumna Aminex HPX-87C, mobilní fáze byla deionizovaná voda. Postkolonově byl přidán 5 mM octan amonný. Byly detekovány kladné ionty  $m/z = 198$ , odpovídající aduktu myoinositolu a amonného kationtu.

### 5.3 Další specifické metody

Metoda kapilární izotachofórey je přímá, rychlá a poměrně jednoduchá a je často využívána v praxi pro různé matrice (Blatný et al., 1995; Dušková et al., 2000; Vaculová et al., 2012). Analýza fytové kyseliny byla rovněž provedena pomocí atomové emisní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem (Grases et al., 2004). Stanovení fytoátů v biologických vzorcích pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (March, 2001) je založeno na čištění anexovou chromatografií, hydrolyze fytoátů na myoinositol a následné derivatizaci na trimethylsilyl derivát. Metoda má srovnatelnou citlivost s LC/MS, je však zdoluhavá a vyžaduje použití vysoce aktivních fytoas s dostatečnou stabilitou.

Spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR) je vynikající analytickou technikou vhodnou pro stanovení IP6 fosfátů a produktů jeho hydrolyzy (IP1-IP5) fosfátů včetně jejich různých stereoizomerů. Je to neinvazivní metoda, nabízí výhody vysoké přesnosti a specifčnosti, nevyžaduje složitou přípravu vzorků, umožňuje přímou detekci všech fosfátových sloučenin v jednom experimentu. 31P-NMR spektroskopie s vysokým rozlišením slouží k určení obsahu fytoátů v rostlinách a v biologických vzorcích, k detekci jeho formy a vazby na ostatní komponenty, nebo ke studiu metabolismu a degradaci fytoátů při zpracování potravin. NMR byla úspěšně aplikována v rutinní analýze k rozlišení

In 2006 Dost and Tokul developed a HPLC method based on the replacement of metal from a colored complex of  $Fe(III)$  thiocyanate. Mayr (1988) used for the detection of inositol phosphates a colored complex of Yttrium and 4-(2-Pyridylazo)resorcinol (PAR). The Yttrium-PAR complex is bleached in the presence of inositol phosphates due to a higher affinity of  $Y^{3+}$  ions to their phosphate groups. The absorbance was measured at 546 nm as a negative peak. It is the most sensitive detection of isomers of inositol phosphates (pmol). Post-column derivatization can be also used (Phillippy, Johnston, 1985, Imanari et al., 1982, Cilliers, Niekerk, 1986).

A reaction based on ligand exchange was also used for the fluorescence detection of inositol phosphates. Irth (1990) removed  $Fe^{3+}$  ions from the 4-methylcumarin-6-methyl iminodiacetic acid ( $Fe^{3+}$ -methylcalcein blue complex) by inositol phosphates. By this ligand exchange reaction the quenching of fluorescence in the presence of  $Fe^{3+}$  ions was attenuated and depending on the inositol phosphates concentration the fluorescence intensity increased. March (1999) used the method based on the activation of the oxidation of 2,2'-dipyridyl keton hydrazone catalyzed by  $Cu^{2+}$  ions resulting in highly fluorescent products to determine phytate in urine.

To detect phytic acid, a less sensitive light scattering detection after HPLC separation (Phillippy et al., 2003) and conductivity detection which can also detect with high sensitivity lower inositol phosphates, were used (Talamond et al., 2000).

HPLC with mass spectrometric detection (LC/MS) was also applied for the determination of phytate in human urine (Perello et al., 2004). The method is based on hydrolysis of phytate and myo-inositol determination after purification by anion-exchange chromatography. Separation was performed on an Aminex HPX-87C column with deionized water as mobile phase. 5 mM ammonium acetate was added consecutively (post-column). Positive ions detected  $m/z = 198$  corresponded to the adduct of myo-inositol with the ammonium cation.

### 5.3 Other specific methods

Capillary isotachopheresis is a direct, rapid and simple method frequently used in practice for various matrices (Blatný et al., 1995; Dušková et al., 2000; Vaculová et al., 2012). Phytic acid was also analyzed using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (Grases et al., 2004). Determination of phytates in biological samples by gas chromatography-mass spectroscopy (March, 2001) is based on purification with anion-exchange chromatography, phytate hydrolysis to myo-inositol and consecutive derivatization to trimethylsilyl derivative. The method has a comparable sensitivity with LC/MS, however, it is time demanding and requires highly active phytases with sufficient stability.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is an excellent analytical technique adequate for the determination of IP6 phosphates and its hydrolysis products (IP1-IP5) including the different stereoisomers. This noninvasive method offers the advantages of high accuracy and specificity, it does not require any complicated sample preparation, allows direct detection of all phosphate compounds within one experiment.

Tab. 1 Obsah fytové kyseliny v obilovinách / *Phytic acid content in cereals*

Obilovina / <i>Cereal</i>	Obsah kyseliny fytové v g/100 g sušiny/ <i>phytic acid content in g/100 g dry matter</i>
Kukuřice / <i>Maize</i>	0.72–2.22
Kukuřičné klíčky / <i>Maize germ</i>	6.39
Pšenice / <i>Wheat</i>	0.39–1.35
Pšeničné otruby / <i>Wheat bran</i>	2.1–7.3
Pšeničné klíčky / <i>Wheat germ</i>	1.14–3.91
Rýže / <i>Rice</i>	0.06–1.08
Rýžové otruby / <i>Rice bran</i>	2.56–8.7
Ječmen / <i>Barley</i>	0.38–1.16
Čirok / <i>Sorghum</i>	0.57–3.35
Oves / <i>Oat</i>	0.42–1.16
Žito / <i>Rye</i>	0.54–1.46
Proso / <i>Millet</i>	0.18–1.67
Tritikale / <i>Triticale</i>	0.50–1.89
Divoká rýže / <i>Wild rice</i>	2.20

Tab. 2 Obsah fytové kyseliny v dalších vybraných plodinách a potravinách / *Phytic acid content in other selected crops and foods*

Potravina/ <i>Food</i>	Obsah fytové kyseliny v g/100 g sušiny/ <i>phytic acid content in g/100 g dry matter</i>
Fazole / <i>Kidney beans</i>	0.61–2.38
Boby / <i>Broad beans</i>	0.51–1.77
Hrášek / <i>Peas</i>	0.22–1.22
Cizrna / <i>Chickpeas</i>	0.28–1.60
Čočka / <i>Lentils</i>	0.27–1.51
Sójové boby / <i>Soybeans</i>	1.0–2.22
Lněné semínko / <i>Linseed</i>	2.15–3.69
Sezamové semeno / <i>Sesame seed</i>	1.44–5.36
Řepkové semeno / <i>Rapeseed</i>	5.3–7.5
Mandle / <i>Almonds</i>	0.35–9.42
Vlašské ořechy / <i>Walnuts</i>	0.20–6.69
Para ořechy / <i>Brazil nuts</i>	0.29–6.34
Kešu ořechy / <i>Cashew nuts</i>	0.19–4.98
Pekanové ořechy / <i>Pecans</i>	0.18–4.52

anorganického fosfátu od různých inositolfosfátů v rostlinných extraktech a potravinových vzorcích (Cosgrove, 1980) a pro studium sloučenin obsahujících fosfor v intaktních tkáních a buněčných suspenzích. NMR vykazuje dobrou shodu ve srovnání s jinými analytickými metodami pro stanovení fytátu v potravinách (Mazzola et al. 1986; Kemme et al., 1999). Pro analýzu NMR není zapotřebí použití standardů inositolfosfátů. Metoda je také schopná rozlišit izomery, které nejsou rozděleny chromatografickou separací. Nízká citlivost metod NMR může způsobit určité potíže při zjišťování nízké koncentrace inositolfosfátů v biologických a fyziologických vzorcích, jako jsou buňky nebo tkáně, další nevýhodou je, že NMR analýzy jsou drahé a vyžadují kvalifikované odborné znalosti potřebné ke správné interpretaci komplexních spekter ze složitých biologických systémů včetně potravin.

Komerčně dostupný set firmy Megazyme stanovuje množství fytové kyseliny v zrnech jako množství celkového fosforu uvolněného z materiálu pomocí enzymu fytasy. U nezpracovaných materiálů se předpokládá, že veškerý měřený fosfor byl uvolněn z (IP6) a toto množství volného fosforu je následně přepočítáno na množství kyseliny fytové. Zpracované výrobky obsahují i nižší inositolfosfáty, ze kterých je uvolněn fosfor působením alkalické fosfatasy. Celkový fosfor je stanoven modifikovanou kolorimetrickou metodou (Phytic acid/phytate assay, Megazyme).

Costa-Bauza et al. (2012) vyvinuli jednoduchou kolorimetrickou metodu pro stanovení fytátu v moči. Vzorky jsou zakonzentrovány pomocí SPE a měřeny kolorimetricky s použitím Fe(III)-thiokyanátu. Fotometrické metody umožňující stanovení fytátu bez hydrolyzy molekuly byly úspěšně použity k měření obsahu fytátu v obilovinách, kořenech a biologických vzorcích, nicméně, s výjimkou stanovení využívajících  $\text{YCl}_3$ -PAR, nejsou dostatečně citlivé ke stanovení fytátu v biologických vzorcích bez předchozího zakonzentrování.

Pro jednoduchou, rychlou a přesnou detekci kyseliny fytové a fytasy byly vyvinuty nové biosenzory (Mak et al., 2004). Biosenzor pro detekci fytasy je založen na imobilizaci pyruvát oxidasy a detekci fosfátových iontů vyrobených hydrolyzou fytové kyseliny. Dvouenzymový biosenzor pro detekci kyseliny fytové je založen na postupné imobilizaci fytasy a pyruvát oxidasy a amperometrické detekci enzymaticky uvolňovaného peroxidu vodíku.

## 6 ZÁVĚR

Můžeme shrnout, že surové nezpracované potraviny obvykle obsahují kolem 90 % fytové kyseliny (IP6), zatímco ve zpracovaných výrobcích bývají různé vysoké podíly částečně defosforylovaných izomerů (IP1-IP5) vzniklých vlivem degradace fytasami nebo zpracovacích podmínek. Nespecifické a kolorimetrické metody jsou proto vhodné pro stanovení obsahu fytové kyseliny u surovin a nezpracovaných produktů, zatímco pro potravinové výrobky a další biologické matrice, které obsahují i nižší inositolfosfáty, je vhodnější použití moderních citlivých metod, například kapalinové chromatografie.

Výzkum fytové kyseliny nepochybně bude i v budoucnu patřit ke světově významným tématům a podle všeho bude zaměřen na získání dalších informací o dietárním příjmu fytové kyseliny, lepší pochopení její absorpce v zažívacím traktu, buněčný příjem inositolfosfátů, roli fytátu v metabolismu a jeho vlivu na lidské zdraví a v neposlední řadě na vývoj a aplikaci specifických analytických metod stanovení v potravinách a biologických vzorcích.

### Poděkování

Práce publikovaná v tomto článku byla finančně podporována z grantu MŠM 6019369701.

High resolution  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy serves for the determination of phytate content in plants and biological samples, the detection of phytate form and bonds to other components or for the study of metabolism and degradation of phytate during food processing. NMR has also been successfully applied in routine analyses to discriminate inorganic phosphate from different inositol phosphates in plant extracts and food samples (Cosgrove, 1980) and to study compound containing phosphorus in intact tissues and cell suspensions. NMR shows good agreement with other analytical methods for the phytate determination in foods (Mazzola et al., 1986; Kemme et al., 1999). Use of inositol phosphate standards for the NMR analysis is not necessary. The method is also able to differentiate isomers that cannot be distinguished by chromatographic separation. Low sensitivity of NMR methods may cause difficulties in detecting low inositol phosphate concentrations in biological and physiological samples, such as cells or tissues; another disadvantage is that the NMR analyses are expensive and require skilled expertise for correct interpretation of complex spectra from complex biological systems including foods.

Commercially available set of the Megazyme company determines the amount of phytic acid in grains as the amount of total phosphorus released from the material by phytase enzyme. In unprocessed materials, it is assumed that all detected phosphorus was released from (IP6) and this amount of free phosphorus is then recalculated to phytic acid content. Processed products also contain lower inositol phosphates, from them phosphorus is released by alkaline phosphatase. The total phosphorus is determined by a modified colorimetric method.

Costa-Bauza et al. (2012) developed a simple colorimetric method for the determination of phytate in urine. Samples are concentrated using SPE and measured colorimetrically with Fe(III)-thiocyanate. Photometric methods allowing to determine phytate without hydrolysis of the molecule were successfully used for the measurement of phytate content in cereals, roots and biological samples, nevertheless with the exception of determinations using  $\text{YCl}_3$ -PAR, they are not sufficiently sensitive for the phytate determination in biological samples without preceding concentration.

New biosensors were developed for a simple, fast and accurate detection of phytic acid and phytase (Mak et al., 2004). Biosensors for the phytase detection are based on the immobilization of pyruvate oxidase and detection of phosphate ions produced by the hydrolysis of phytic acid. The bi-enzyme biosensor for the detection of phytic acid is based on the gradual immobilization of phytase and pyruvate oxidase and amperometric detection of enzymatically released hydrogen peroxide.

## 6 CONCLUSION

We can summarize that raw unprocessed foods usually contain about 90% of phytic acid (IP6), while the processed products contain differently high rates of partly dephosphorylated isomers (IP1-IP5) produced by the degradation with phytases or processing conditions. The non-specific and colorimetric methods are therefore suitable for the determination of phytic acid in raw materials and unprocessed products, while for food products and other biological matrices containing also lower inositol-phosphates, the use of modern sensitive methods such as liquid chromatography is a more adequate method.

Undoubtedly, research into phytic acid will belong to world important topics in the future as well and most probably, it will focus on obtaining other information on dietary intake of phytic acid, better understanding of its absorption in the alimentary tract, cell intake of inositol phosphates, phytate role in the metabolism and its effect on human health and last but not least, the development and application of specific analytical methods for the determination in foods and biological samples.

### Acknowledgements

The presented study was supported by the grant of MEYS 6019369701.

Translated by Vladimíra Nováková

### LITERATURA / REFERENCES

- Anderson, R. J., 1914: A contribution to the chemistry of phytin. J. Biol. Chem. 17: 171–190.  
Association of Official Analytical Chemists, 1986: AOAC method 986.11: Phytate in foods – Anion-exchange method. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69: 356–357.  
Bitar, K., Reinhold, J. G., 1982: Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man. Biochim. Biophys. Acta 268: 442–452.

- Blatny, P., Kvasnicka, F., Kenndler, E., 1995: Determination of phytic acid in cereal grains, legumes, and feeds by capillary isotachopheresis. Agr. Food Chem. 43: 129–131.  
Casares, R., Moreno, L., 1951: Determination De Acido Inositoloso Forico. Anales de Bromatologia 3: 245–257.  
Cilliers, J. J. L., van Niekerk, P. J., 1986: LC determination of phytic acid in food by postcolumn colorimetric detection. J. Agric. Food Chem. 34: 680–683.

- Common, R. H., 1940: The phytic acid content of some poultry feeding stuffs. *The Analyst* 65: 79–83.
- Cosgrove, D. J., 1980: *Inositol Phosphates. Their chemistry, Biochemistry and Physiology*, Elsevier Scientific Publication Company, New York.
- Costa-Bauza, A., Grasses, F., Gomila, I., Rodriguez, A., Prieto, R. M., Tur, T., 2012: A simple and rapid colorimetric method for determination of phytate in urine. *Urol. Res.* 40(6): 663–669.
- Dorsch, J. A., Cook, A., Young, K. A., Anderson, J. M., Bauman, A. T., Volkmann, C. J., Murthy, P. N., Raboy, V., 2003: Seed phosphorus and inositol phosphate phenotype of barley low phytic acid genotypes. *Phytochemistry* 62(5): 691–706.
- Dost, K., Tokul, O., 2006: Determination of phytic acid in beet and wheat products by reverse phase high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 558: 22–27.
- Du, Y., Dou, S., Wu, S., 2012: Efficacy of phytic acid as an inhibitor of enzymatic and non-enzymatic browning in apple juice. *Food Chem.* 135(2): 580–582.
- Dušková, D., Marounek, M., Březina, P., 2000: Determination of phytic acid in feeds and faeces of pigs and poultry by capillary isotachopheresis. *J. Sci. Food Agric.* 81: 36–41.
- Garcia-Villanova, R., Garcia-Villanova, R. J., Ruiz de Lope, C., 1982: Determination of phytic acid by complexometric titration of excess of iron. *Analyst* 107: 1503–1506.
- Graf, E., Eaton, J. W., 1990: Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 8: 61–69.
- Graf, E., Dintzis, F. R., 1982: High performance liquid chromatographic method for the determination of phytate. *J. Agric. Food Chem.* 30: 1094–1097.
- Grases, F., Perello, J., Isern, B., Prieto, R. M., 2004: Determination of myo-inositol hexakisphosphate (phytate) in urine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 510: 41–45.
- Greiner, R., Egli, J., 2003: Determination of the activity of acidic phytate-degrading enzymes in cereal seeds. *J. Agric. Food Chem.* 51: 847–850.
- Harland, B. F., Oberleas, D., 1977: A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure: application to textured vegetable proteins. *Cereal Chem.* 54: 827–832.
- Hartig, T., 1855: Über das Klebermehl. *Bot. Z.* 13: 881–882.
- Hartig, T., 1856: Weitere Mitteilungen, das Klebermehl (Aleuron) betreffend. *Bot. Z.* 14: 257–269.
- Haug, W., Lantzsch, H. J., 1983: Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products. *J. Sci. Food Agr.* 34: 1423–1426.
- Hégrová, B., 2006: Využití nových analytických metod při analýzách ječmene a sladu. VUT v Brně.
- Heubner, W., Stadler, H., 1914: *Biochem. Z.* 64: 422–437.
- Imanari, T., Tanabe, S., Toida, T., Kawanishi, T., 1982: High performance liquid chromatography of inorganic anions using Fe<sup>3+</sup> as a detection reagent. *J. Chromatogr.* 250: 55–61.
- Irth, H., Lamoree, M., De Jong, G. J., Brinkman, U. A. T., Frei, W., 1990: Determination of D-myo-1,2,6-inositol trisphosphate by ion-pair reversed phase liquid chromatography with post column ligand exchange and fluorescence detection. *J. Chromatogr.* 499: 617–625.
- Irvine R. F., 2005: Inositol evolution – towards turtle domination? *J. Physiol.* 566(2): 295–300.
- Irving, G. C. J., Cosgrove, D. J., 1971: Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. Some properties of a partially purified bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *Aust. J. Biol. Sci.* 24: 547–557.
- Jenab, M., Thompson, L. U., 2002: in: Reddy, N. R., Sathe, S. K. (Eds.), *Food Phytates*, CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, DC.
- Kemme, P. A., Lommen, A., De Jonge, L. H., Van der Klis, J. D., Jongbloed, A. W., Mroz, Z., Beynen, A. C., 1999: Quantification of Inositol phosphates using <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy in animal nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 47 (12): 5116–5121.
- K-PHYT [online] <http://www.megazyme.com/downloads/en/data/K-PHYT.pdf>
- Latta, M., Eskin, M., 1980: A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J. Agric. Food Chem.* 28: 1313–1315.
- Lehrfeld, J., 1994: HPLC separation and quantitation of phytic acid and some inositol phosphates in foods: problems and solutions. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2726–2731.
- Mak W. Ch., Ng Y. M., Chan, Ch., Kwong, W. K., Renneberg, R., 2004: Novel biosensors for quantitative phytic acid and phytase measurement. *Biosens. Bioelectron.* 19: 1029–1035.
- March, J. G., Simonet, B. M., Grases, F., 1999: Fluorimetric determination of phytic acid based on the activation of 2,9-di-pyridyl ketone hydrazone catalysed by Cu(II). *Analyst* 124: 897–900.
- March, J. G., Simonet, B. M., Grases, F., 2001: Determination of phytic acid by gas chromatography-mass spectroscopy: Application to biological samples. *J. Chromatogr. B* 757: 247–255.
- Marounek, M., 2004: Význam kyseliny fytové ve výživě zvířat a lidí a důsledky její přítomnosti v krmivech a potravinách. *Vědecký výbor výživy zvířat, VÚŽV Praha–Uhřetěves*: 31 s.
- 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 specimen. *Biochem. J.* 254: 585–591.
- Mazzola, E. P., Phillippy, B. Q., Harland, B. F., Miller, T. H., Potemra, J. M., Katsimpiris, E. W., 1986: Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of phytate in foods. *J. Agric. Food Chem.* 34: 60–62.
- Nayani, N. R., Markakis, P., 1984: The phytase of yeast. *Lebensm. Wiss. Technol.* 17: 24–26.
- Oberleas, D., Harland, B. F., 1986: in: Graf, E. (Ed.), *Phytic acid – Chemistry Applications*, Pilatus Press, Minneapolis.
- Perello, J., Isern, B., Munoz, J. A., Valiente, M., Grases, F., 2004: Determination of phytate in urine by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 60: 265–268.
- Pfeffer, W., 1872: Untersuchungen über die Proteinkörner und die Bedeutung des Asparagins beim Keimen der Samen. *Jahrb. Wiss. Bot.* 8: 429–574.
- Phillippy, B. Q., Bland, J. M., Evens, T. J., 2003: Ion chromatography of phytate in roots and tubers. *J. Agric. Food Chem.* 51: 350–353.
- Phillippy, B. Q., Johnston, M. R., 1985: Determination of phytic acid in foods by ion chromatography with post-column derivatization. *J. Food Sci.* 50: 541–542.
- Powar, V. K., Jagannathan, V., 1967: Phytase from *Bacillus subtilis*. *Ind. J. Biochem.* 4: 184–187.
- Samotus, B., Schwimmer, S., 1962: Indirect method for determination of phytic acid in plant extracts containing reducing substances. *Biochim. Biophys. Acta* 57: 389–391.
- Sandberg, A. S., Ahderinne, R., 1986: HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta- and hexaphosphates in foods and intestinal contents. *J. Food Sci.* 51: 547–550.
- Shamsuddin, A. M., 2002: Anti-cancer function of phytic acid. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37: 769–782.
- Schlemmer, U., Frohlich, W., Prieto, R. M., Grasses, F., 2009: Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Mol. Nutr. Food Res.* 53: S330–S375.
- Schlemmer, U., Jany, K. D., Berk, A., Schulz, E., Rechkemmer, G., 2001: Degradation of phytate in the gut of pigs – Pathway of gastrointestinal inositol phosphate hydrolysis and enzymes involved. *Arch. Anim. Nutr.* 55: 255–280.
- Singh, R. P., Agarwal, R., 2005: Prostate cancer and inositol hexaphosphate: Efficacy and mechanisms. *Anticancer Res.* 25: 2891–2904.
- Smith, D. H., Clark, F. E., 1952: Chromatographic separations of inositol phosphorous compounds. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.* 16: 170–173.
- Talamond, P., Doubeau, S., Rochette, I., Guyot, J. P., 2000: Anion-exchange high-performance liquid chromatography with conductivity detection for the analysis of phytic acid in food. *J. Chromatogr. A*, 871: 7–12.
- Tangendjaja, B., Buckle, K. A., Wootton, M., 1980: Analysis of phytic acid by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 197: 274–277.
- Vaculová, K., Balounová, M., Kvasnička, F., Sedláčková, I., Ehrenbergerová, J., Václavíková, E., Pouch, M., 2012: Variabilita kyseliny fytové v zrna ječmene. *Kvasný průmysl* 58(4): 100–108.
- Velíšek, H., 2009: *Chemie potravin 1*, Osis, Tábor.
- Vucenik, I., Shamsuddin, A. M., 2006: Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. *Nutr. Cancer*, 55: 109–125.
- Wise, A., 1983: Dietary factors determining the biological activities of phytate. *Nutr. Abstr. Rev.* 53: 791–806.
- Xu, P., Price, J., Agget, P. J., 1992: Recent advances in methodology for analysis of phytate and inositol phosphates in foods. *Prog. Food Nutr. Sci.* 16: 245–262.
- Young, L., 1936: The determination of phytic acid. *Biochemistry* 17: 252–257.