

# Prednosti in slabosti živil, obogatenih s fitati

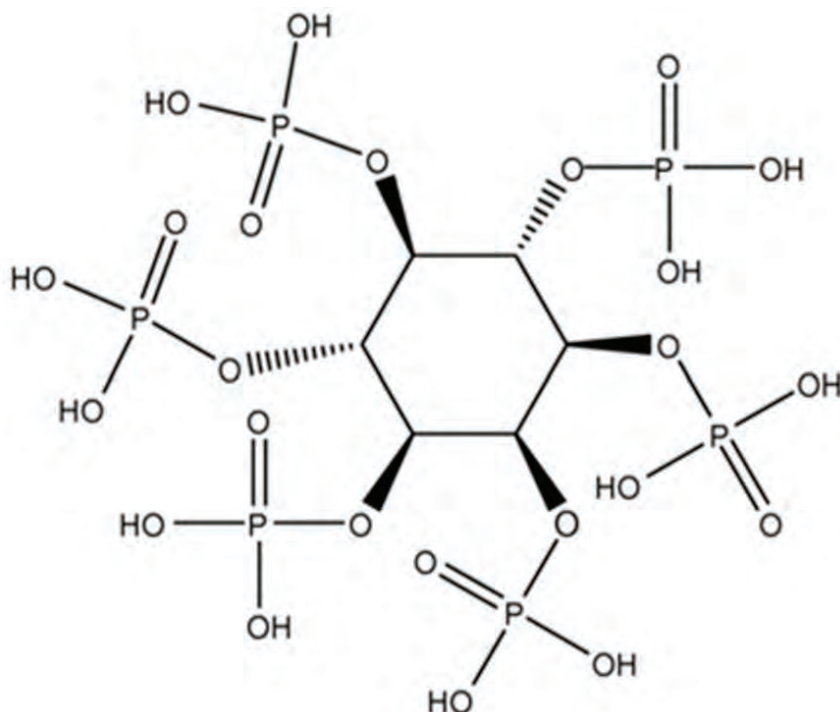
*Ema Gričar, Gregor Marolt, Mitja Kolar*

Uporabnost fitinske kisline in njenih soli – fitatov – v zadnjih desetletjih raste, kar se kaže v številu publikacij na področju raziskav kislinsko-bazičnih lastnosti in predvsem biološke vloge omenjene spojine. Fitinska kislina je namreč naravna spojina, ki jo najdemo v skoraj vseh evkariontskih celicah, tudi človeških. V obliki koordinacijskih spojin, kjer tvori stabilne komplekse z različnimi kovinskimi ioni, opravlja vlogo sekundarnega sporočevalca, deluje kot zaščita bioloških makromolekul pred oksidativnim stresom, povezujejo pa jo celo s protirakovim delovanjem. Raziskave kažejo, da ljudje z običajno prehrano dnevno zaužijemo približno en gram fitinske kisline in njej sorodnih spojin (Kumar, Sinha, Makkar, Becker, 2010).

Fitinska kislina je pomembna na biološkem, okoljskem in tehničnem področju. Njeno kemijsko ime se glasi: myo-inozitol 1,2,3,4,5,6-heksakis(dihidrogenfosfat) (slika 1).

Gre za fosforilirani ester myo-inozitola, ki je v vodi razmeroma dobro topen, kar je ključnega pomena za njegovo biološko aktivnost. Kislinsko-bazične lastnosti fitinske kisline so zelo kompleksne, saj ima kislina kar dvanajst protonov, ki jih je mogoče izmenjati (Graf, 1983). Interakcije znotraj kompleksov fitat-kovina so tipično elektrostatskega tipa, saj so

*Slika 1: Struktura fitinske kisline. Vir: Crea, 2008.*



fitati negativno nabiti (deprotonirani) v širokem pH-območju. Pri fiziološkem pH (7,0–7,5) fitinska kislina odda že od 7 do 9 od skupno 12 protonov. Deprotonirana oblika, torej fitat, je dober ligand za različne pozitivno nabite ione, saj namreč tvori precej obstojne komplekse z večvalentnimi ioni: na primer  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  in tako dalje. Najpomembnejšo biološko vlogo izmed kompleksov z večvalentnimi ioni pa ima kompleks s  $\text{Fe}^{2+}$  oziroma  $\text{Fe}^{3+}$  ioni (Marolt, 2011; Gričar, 2016).

Fitati so v bioloških sistemih najbolj zastopani v celičnih membranah, kjer so povezani z lipidi, v taki obliki pa imajo pomembno vlogo pri celični signalizaciji. V naravi najdemo fitate večinoma v obliki mešanih kalcijevih, magnezijevih in natrijevih soli, imenovanih fitini. V rastlinskih semenih stročnic in žit predstavljajo glavno zalogo fosforja, v živalskih celicah pa opravljajo vlogo antioksidantov in živčnih prenašalcev (Maga, 1982). Mehanizmi delovanja sicer še niso dokončno raziskani. Antioksidativna vloga fitatov je neposredno povezana s kompleksiranjem železovih in bakrovih ionov (Marolt, 2011). Poleg tega so fitati tudi antinutrienti, kar pomeni, da zavirajo absorpcijo nekaterih esencialnih mineralov, pozitivno nabitih proteinov, ogljikovih hidratov in lipidov. Tudi ta vloga je povezana s tvorbo obstojnih kompleksov, ki zmanjšajo biološko uporabnost omenjenih hranil. Enega izmed najpogostejših problemov današnje prehrane, pomanjkanje železa, prav tako povezujejo s tvorbo obstojnih kompleksov med železovimi ioni in fitati (Kumar, Sinha, Makkar, Becker, 2010). Vežava kovinskih ionov pa nima le negativnih posledic, saj lahko na drugi strani tudi prepreči absorpcijo v telo ali celo povzroči izločanje težkih kovin (na primer ob zastrupitvi s strupenim kadmijem) iz telesa.

Oksidativne poškodbe celic so prisotne pri vseh aerobnih organizmih, posebej pogoste pa so pri organizmih, pri katerih poteka fotosinteza. Pride namreč do nastanka prostih radikalov, od katerih so najpomembnejše reaktivne kisikove zvrsti (ROS), ki nastanejo iz superoksidnega radikala. Zaradi visoke reaktivnosti te zvrsti

povzročajo hude poškodbe tkiva (Marolt, 2015). Največ takih zvrsti nastane v mitohondrijih, zato je mitohondrijska DNA tudi najbolj dovzetna za poškodbe. Jedrna DNA in RNA sta prav tako nagnjeni ne le k napakam v translaciji in transkripciji, temveč tudi k oksidativnim poškodbam. Prav te poškodbe so po nekaterih raziskavah med razlogi za razvoj rakavih obolenj, ublažiti oziroma zavirati pa jih je mogoče s prisotnostjo antioksidantov, med katere sodijo tudi fitati. Kot smo že omenili, fitati namreč kompleksirajo redoks par  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ , ki deluje kot katalizator Haber-Weissovega cikla, ki zajema tudi Fentonovo reakcijo, pri kateri pride do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti, natančneje zelo reaktivnih in nevarnih hidrosilnih radikalov ( $\cdot\text{OH}$ ). Ti so zaradi svojega kratkega razpolovnega časa ( $t_{1/2} < 10^{-9}\text{s}$ ) izjemno destruktivni oksidanti za biološke molekule in tkiva (Gričar, 2016). Večina bioloških ligandov tvorbe  $\cdot\text{OH}$  ne prepreči, fitati pa učinkovito zavirajo njegov nastanek, saj tvorijo obstojne komplekse z železovimi ioni, ki tako ne morejo vstopati v Haber-Weissovo cikel in posledično katalizirati Fentonove reakcije. Poleg tega fitati tudi katalizirajo oksidacijo  $\text{Fe}^{2+}$  ionov v  $\text{Fe}^{3+}$  ione z molekularnim kisikom in s tem zmanjšajo količino  $\text{Fe}^{2+}$  ionov, ki so potrebni za Fentonovo reakcijo. Oba učinka znatno upočasnita nastanek  $\cdot\text{OH}$ , to pa se kaže kot antioksidativno in protirakavo delovanje. Fitati naj bi tako imeli zdravilni učinek proti raku na debelem črevesju, dojkah, prostati in kostnem mozgu (Vučenik, Shamsuddin, 2003). Dodatek fitatov k prehrani pa dokazano znižuje nastanek predrakavih sprememb na debelem črevesju pri podganah. Ena izmed največjih prednosti fitatov je, da so naravnega izvora in netoksični, povzročajo malo ali nobenih stranskih učinkov, zato bi v obliki prehranskih dodatkov lahko imeli pomembno preprečevalno vlogo.

Poleg biološke in prehranske vloge pa so se fitati kot uporabni pokazali na primer v nuklearni medicini za diagnostične in terapevtske namene. Raziskave so pokazale, da jih lahko v kombinaciji z radioaktivnim lutecijem ( $^{177}\text{Lu}$ ) uporabljamo za zdravljenje artritisa

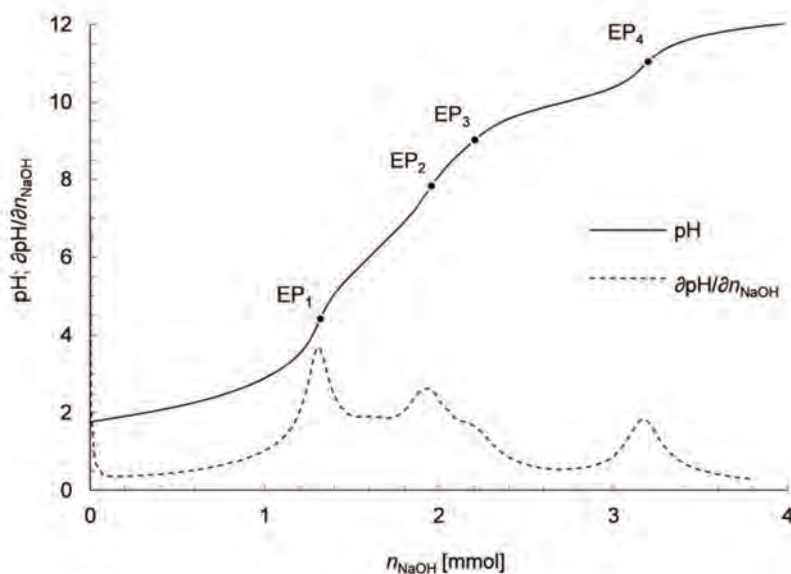
in nekaterih drugih težav s sklepi. Uporabni so tudi pri scintigrafiji, in sicer v kombinaciji z radioaktivnim tehnicijem ( $^{99m}\text{Tc}$ ). Za ta postopek so bili v letih 2013 in 2014 že izvedeni prvi klinični testi. V zobni medicini kažejo fitati obetavne rezultate kot dodatek zalivkam, saj so odporni proti kislinski koroziji, a so bili raziskovalci soočeni s problemom oprijema takšnih zalivk na zobovino. Fitati so uporabni celo v ekologiji, in sicer za remediacijo tal, kontaminiranih s težkimi kovinami (kromom, nikljem, svincem, cinkom, kadmijem, evropijem, radijem, uranom). S tvorjenjem kompleksov namreč učinkovito imobilizirajo težke kovine in celo nekatere herbicide (Gričar, 2016; Marolt, 2015).

Na lastnosti fitatov pomembno vpliva njihovo vedenje v raztopinah, kjer tudi pride do interakcij s kovinskimi ioni in drugimi pozitivno nabitimi delci. Za razumevanje kovinskih kompleksov moramo torej poznati osnovne kislinsko-bazične lastnosti fitatov. Naboj fitatov se giblje med nevtralnimi ( $\text{H}_1\text{2Phy}$ ) in 12- ( $\text{Phy}^{12-}$ ). Določanje konstant deprotonacije vseh dvanajstih stopenj pomeni velik izziv. Raziskovalci, ki so se ukvarjali

s kvantitativnimi podatki o konstantah protonacije fitinske kisline in obstojnosti različnih kovinskih kompleksov, so pri svojem delu najpogosteje uporabljali potenciometrične titracije, spektroskopske metode (jedrsko magnetno resonanco, ultravioletno in vidno spektrofotometrijo ...) in voltametrične metode. Pogosto je treba za določanje konkretnih vrednosti stabilnostnih konstant naštetih metode kombinirati z računalniškimi simulacijami – predpostavljeni teoretični model prilagajamo glede na eksperimentalne podatke (Marolt, Pihlar, 2015; Marolt, Šala, Pihlar, 2015).

Titracija je analizna metoda, s katero določamo množino znane snovi. Klasična titracija poteka z uporabo barvnih indikatorjev (na primer fenolftaleina), pri določanju koncentracije fitinske kisline pa nam najbolj služi potenciometrična titracija (slika 2).

Tudi v tem primeru gre za nevtralizacijsko titracijo, torej raztopini fitinske kisline dodajamo bazo znane koncentracije, poleg tega pa s pomočjo pH-elektrode med titracijo merimo pH. Opazujemo odvisnost pH od dodatka znane količine baze in tako dobimo titracijsko krivuljo. Ta nam lahko služi za



Slika 2:  
Titracijska krivulja čiste fitinske kisline.  
Vir: Marolt, 2011 -  
diplomsko delo.

določitev množine oziroma koncentracije iskane snovi v vzorcu, poleg tega pa lahko s primerjavo titracijskih krivulj, pridobljenih iz raztopin, kjer smo spreminjali na primer molsko razmerje med kislino in izbranimi kovinskimi ioni, dobimo pomembne podatke o vezavi kovinskih ionov na fitate in obstojnosti takih kompleksov. Oblika titracijske krivulje fitinske kisline (Phy) kaže precej kompleksne lastnosti zaradi velikega števila protonov in podobne obstojnosti nekaterih stopenj deprotonacije (slika 2). Le nekatere stopnje namreč povzročijo dovolj veliko spremembo v pH-vrednosti, da to lahko zaznamo kot ekvivalentno točko na titracijski krivulji (Marolt, Pihlar, 2015). Oblika krivulje pa je odvisna tudi od titranta (baze, ki jo dodajamo) ter medija, v katerem je fitinska kislina oziroma fitat raztopljen. V grobem delimo protone na fitinski kislini v tri skupine. V prvi skupini je šest najbolj kislil protonov, ki pripadajo vsak po eni fosfatni skupini. V drugi in tretji skupini so po trije protoni, v nekaterih okoliščinah tudi dva in štirje, ki so manj kislil in se odcepijo pri višjem pH. Pri idealni titraciji fitinske kisline bi tako opazili tri izrazite ekvivalentne točke, ki predstavljajo šesti, osmi in dvanajsti deprotonacijski korak. V realnosti pa običajno zaznamo od dve do štiri ekvivalentne točke, za pomoč pri določitvi teh točk pa uporabimo prvi oziroma drugi odvod titracijske krivulje (Marolt, 2015).

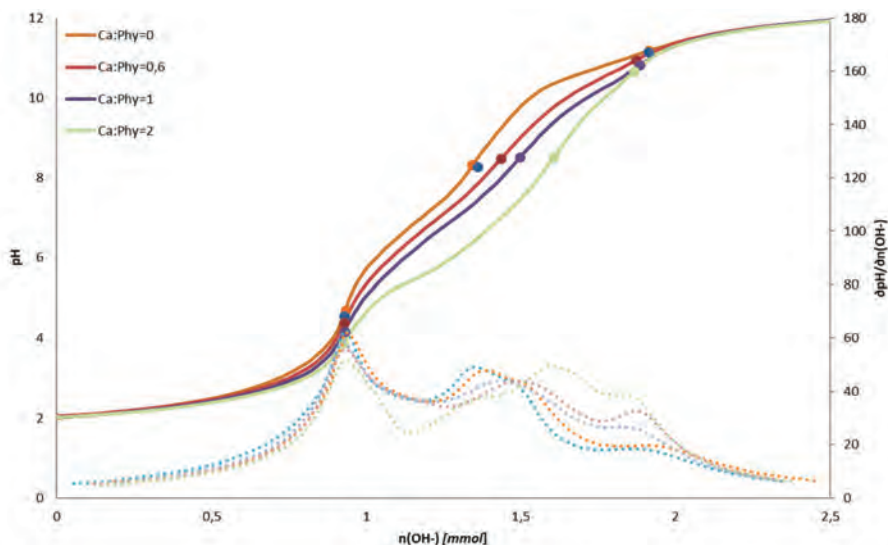
V preteklosti se je kot ena izmed prvih neposrednih metod za določanje fitinske kisline uporabljala obarjalna titracija s  $\text{Fe}^{3+}$  ioni. Obarjalna titracija pomeni, da raztopljeno snov, kateri želimo določiti koncentracijo, z dodajanjem reagenta prevedemo v oborino, torej trdno obliko. Tovrstne titracije so se v primeru fitinske kisline sčasoma pokazale za nezanesljive, saj se molsko razmerje med železom in fitati v oborini spreminja glede na razmere v raztopini (Gričar, 2016). Tako je postalo jasno, da je fitinski kislini mogoče neposredno določiti koncentracijo le z nevtralizacijsko titracijo. Tudi pri takem postopku obstaja nekaj težav. Poraba baze do prve ekvivalentne točke nam poda informacijo o množini popolnoma protonirane zvrsti, v realnih vzorcih pa tudi ob meritvi

pH zaradi podobnih konstant kislosti več protonov ne moremo natančno poznati stopnje začetne protonacije fitata v preiskovanem vzorcu. Titracijo nato nadaljujemo do druge ekvivalentne točke. Na tem mestu še vedno ne vemo natančno, koliko protonov se je izmenjalo med prvo in drugo ekvivalentno točko, saj se odvisno od razmer lahko izmenjajo trije ali pa le dva. Titracijo moramo torej izpeljati do konca, torej do pH približno 12, saj bo pri taki vrednosti fitat popolnoma deprotoniran – odcepil se bo zadnji (to je dvanajsti) proton (Marolt, Pihlar, 2015).

Zdaj že vemo, da fitati tvorijo komplekse z različnimi pozitivno nabitimi delci. V naslednjem koraku nas zanima, kako obstojni so nastali kompleksi, torej kako močne interakcije tvorijo določeni pozitivno nabiti ioni s fitatom. Te informacije je možno dobiti s primerjavo titracijskih krivulj, pridobljenih pri titracijah fitinske kisline v prisotnosti iona, ki ga preiskujemo. V primeru dodatka različnih količin kalcijevih ionov opazimo tri ekvivalentne točke, od katerih se druga ob dodatku večje količine kalcijevih ionov pomika proti večji porabi baze (slika 3).

To pomeni, da kalcijevi ioni povečajo kislost protonov (omogočajo jim lažje odcepitev), ki se izmenjajo med prvo in drugo ekvivalentno točko, kar se na titracijski krivulji kaže kot nižji pH pri enakem dodatku baze. V tem območju torej kalcijevi ioni tekmujejo s protoni za vezavna mesta na fitatu in tako se tvorijo kompleksi med fitatom in kalcijevimi ioni (Marolt, 2015). Ti kompleksi so pri nizkih koncentracijah kalcija topni, pri visokih pa postajajo slabo topni, kar opazimo kot motnost (izločanje trdnih delcev) v raztopini. Zelo podobno velja za vse dvovalentne ione, na primer za  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  in  $\text{Zn}^{2+}$ . Kompleksi fitatov z ioni, ki imajo večjo gostoto naboja, so obstojnejši: ker je  $\text{Mg}^{2+}$  na primer manjši od  $\text{Ca}^{2+}$  in ima posledično večjo gostoto pozitivnega naboja, bo kompleks z magnezijevimi ioni obstojnejši (Crea, De Stefano, Milea, Sammartano, 2008).

Med fitati in pozitivno nabitimi delci deluje elektrostatski privlak, ki postane izrazitejši pri višjih nabojih. Logično je torej, da trivalentni



Slika 3: Vpliv dodatka  $\text{Ca}^{2+}$  ionov na potek titracijske krivulje.

Vir: Gričar, 2016 - diplomsko delo.

(trikrat nabit) kationi s fitati tvorijo komplekse, ki so obstojnejši od kompleksov z dvovalentnimi ioni. To pa ni edina razlika med kompleksi z dvovalentnimi in trivalentnimi ioni. Če raztopini fitinske kisline dodajamo  $\text{Fe}^{3+}$  ione, opazimo, da pride do premika vseh treh ekvivalentnih točk (slika 4).

To pomeni, da imajo  $\text{Fe}^{3+}$  ioni večji vpliv na kislinsko-bazične lastnosti fitinske kisline kot na primer  $\text{Fe}^{2+}$  ioni, poleg tega pa gre pri trikrat nabitih ionih za drugačne interakcije kot pri dvakrat nabitih ionih. Trivalentni ioni (za razliko od dvovalentnih) povečajo kislost protonov fitinske kisline v celotnem pH-območju, zgoj iz pogleda na titracijske krivulje pa lahko trdimo, da trivalentni ioni s protoni tekmujejo za druga vezavna mesta kot dvovalentni ioni. To trditev je možno preveriti s titracijo fitinske kisline v prisotnosti tako dvovalentnih kot trivalentnih ionov. Opazimo, da na podlagi teh rezultatov lahko na primer razlikujemo med vzorcem, kontaminiranim s dvovalentnimi ioni, in vzorcem, kontaminiranim s trivalentnimi ioni (Marolt, 2015; Crea, De Stefano, Milea, Sammartano, 2008).

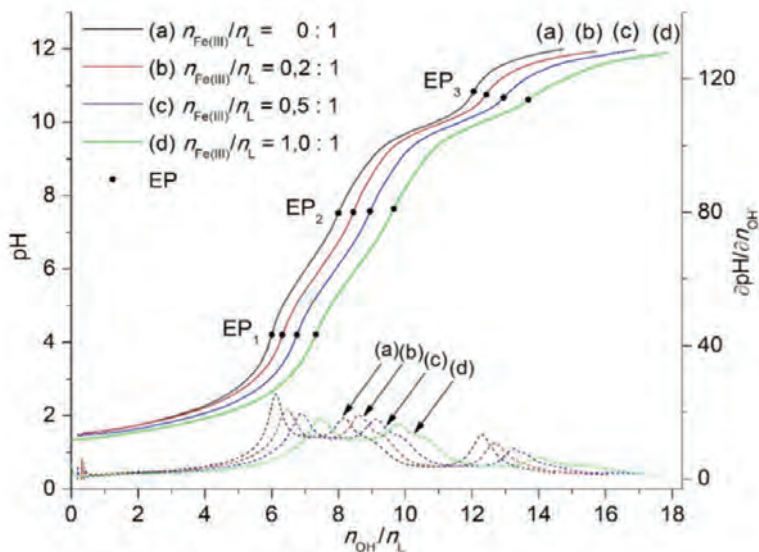
Fitati so torej spojine, s katerimi se, velikokrat tudi nevede, srečujemo vsak dan. Mnogi raziskovalci, vključno z našo raziskovalno skupino, se ukvarjajo z različnimi vidiki in aplikacijami fitatov. Študij tvorjenja kompleksov z različnimi pozitivno nabitimi delci je še posebej pomemben, saj lahko le na ta način ustrezno opredelimo vlogo fitatov. Pomembno je tudi, kako obstojni so nastali kompleksi, saj je v celici hkrati prisotno izjemno veliko število različnih zvrsti, med njimi tudi takih, ki s fitati tvorijo komplekse. S poznavanjem obstojnosti lahko napovemo, kateri kompleksi se bodo tvorili prednostno in kakšna bo njihova vloga v bioloških sistemih.

Nemogoče je nedvoumno trditi ali potrditi, da so fitati res dodana vrednost k naši prehrani ali ne, saj je to odvisno od velikega števila dejavnikov. Dejstvo je, da imajo precej pozitivnih lastnosti: niso toksični, so naravnega izvora, delujejo antikancerogeno in imajo izražene antioksidativne lastnosti. Po drugi strani pa s prevelikim uživanjem hrane, bogate ali obogatene s fitati, zmanjšamo biorazpoložljivost mnogih hranil in mineralov v našem telesu. Da bi potencial fitatov popolnoma izkoristili, bodo potrebne dodatne raziskave in klinični testi.

Slika 4:

Vpliv dodatka  $\text{Fe}^{3+}$  ionov na potek titracijske krivulje.

Vir: Marolt, 2015 – doktorska disertacija.



## Slovarček:

### Biološka uporabnost ali biorazpoložljivost.

Farmakokinetična lastnost učinkovine oziroma njen delež ali delež določene zvrsti ali snovi, ki je v nespremenjeni obliki razpoložljiva v krvnem obtoku ali izbranem tkivu.

**Haber-Weissov cikel.** Vrsta verižnih reakcij, pri katerih nastanejo kisikove reaktivne zvrsti.

**Kisli protoni.** Vodikovi ioni, ki imajo težnjo po disociiranju iz molekule (kislina).

**Redoks par.** Pojem, ki označuje oksidirano in reducirano zvrst neke spojine ali elementa ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ).

**Redoks potencial.** Potencial, pri katerem se določena zvrst oksidira ali reducira. Je merilo za težnjo po redoks reakciji za določeno zvrst.

**Titracija.** Kvantitativna volumetrična analitična metoda za določanje koncentracije znane snovi. Kadar je snov, ki jo določamo, kislina ali baza, govorimo o nevtralizacijski titraciji.

**Ekvivalentna točka.** Označuje stanje sistema pri titraciji, kjer smo dodali tolikšno množino reagenta, da smo nevtralizirali vso kislino/bazo v vzorcu.

**Večvalentni ioni.** Ioni, katerih naboj ima absolutno vrednost, višjo od 1.

**Kovine prehoda.** Elementi v periodnem sistemu, ki se nahajajo v skupinah od 3 do 12. Vsi imajo vsaj delno polne d-orbitale, kar je razlog za njihove raznolike lastnosti in jim daje možnost tvorjenja ionov različnih valenc.

## Literatura:

- Kumar, V., Sinba, A. K., Makkar, H. P. S., Becker, K., 2010: *Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. Food Chemistry*, 120 (4): 945–959.
- Graf, E., 1983: *Applications of phytic acid. Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60: 1861–1867.
- Marolt, G., 2011: *Interakcije železovih(III) ionov s fitati: diplomsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.*
- Gričar, E., 2016: *Potentiometrične titracije pri študiju interakcij fitatov z izbranimi kovinskimi ioni: diplomsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.*
- Maga, J. A., 1982: *Phytate – its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 1–9.
- Marolt, G., 2015: *Študij interakcij med železovimi ioni in fitati: doktorska disertacija. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.*
- Vučenič, I., Shamsuddin, A. M., 2003: *Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. Journal of Nutrition*, 133: 3778–3784.
- Marolt, G., Piblar, B., 2015: *Potentiometric determination of phytic acid and investigations of phytate interactions with some metal ions. Acta Chimica Slovenica*, 62 (2): 319–327.
- Marolt, G., Šala, M., Piblar, B., 2015: *Voltammetric Investigation of Iron(III) Interactions with Phytate. Electrochimica Acta*, 176: 1116–1125.
- Crea, F., De Stefano, C., Milea, D., Sammartano, S., 2008: *Formation and stability of phytate complexes in solution. Coordination Chemistry Reviews*, 252 (10–11): 1108–1120.