

文章编号:1008-1542(2019)05-0446-08

食品中叶酸分析方法及稳定性研究进展

康文怀,叶晓利,李慧,李巧玲,秦玲

(河北科技大学生物科学与工程学院,河北石家庄 050018)

摘要:通过优化样品前处理体系,建立精确的叶酸分析检测方法,对促进叶酸的多方面、深层次研究具有迫切的现实意义。介绍了叶酸的分子结构及其主要存在形式,以及常见食品中叶酸的含量。阐述了化学法和酶解法等样品前处理方法,分析表明在测定富含淀粉、蛋白质的豆类、谷物等食品中的叶酸时,更适合采用与淀粉酶、蛋白酶等联合使用的酶解法。综述了微生物法、荧光分析法、液相色谱法等常见叶酸检测方法,指出高效液相色谱-质谱联用法可快速测定不同形式的叶酸,且具有高效、精确等特点。探讨了影响叶酸稳定性的因素,以及提高叶酸摄入量和稳定性的措施,认为可通过在主粮作物中添加叶酸、蛋白质胶囊包裹叶酸、促进叶酸与蛋白质结合等方式来提高叶酸的摄入量及其稳定性。

关键词:食品检验学;叶酸;提取;农产品;稳定性

中图分类号:TS210.1 文献标志码:A doi:10.7535/hbkd.2019yx05010

Advances in research on analysis methods and stability of folic acid in food

KANG Wenhui, YE Xiaoli, LI Hui, LI Qiaoling, QIN Ling

(School of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China)

Abstract: It is urgently and practically significant to optimize the sample pretreatment, and to establish accurate detection of folic acid content in food and the presence of folic acid, in order to promote the in-depth research of various aspects of folic acid. In the paper, the molecular structure of folic acid and its main forms, as well as the content of folic acid in common foods are introduced. The sample pretreatment methods such as chemical method and enzymatic hydrolysis method are described. It is indicated that the enzymatic hydrolysis method is more suitable for the determination of folic acid in foods such as beans and grains, so that the folic acid combined with protein, starch and the like is fully hydrolyzed by using a combination of protease and amylase. The common methods for detecting folic acid, such as microbial method, fluorescence analysis method and high performance liquid chromatography (HPLC), are reviewed. HPLC is characterized by high efficiency and precision, especially

收稿日期:2019-04-30;修回日期:2019-07-28;责任编辑:王海云

基金项目:河北省科技厅重点研发计划项目(1822712828D);农业部农产品加工重点实验室项目(2018)

第一作者简介:康文怀(1971—),男,山西高平人,副教授,博士,主要从事食品发酵方面的研究。

E-mail: kwshx@sina.com

康文怀,叶晓利,李慧,等.食品中叶酸分析方法及稳定性研究进展[J].河北科技大学学报,2019,40(5):446-453.

KANG Wenhui, YE Xiaoli, LI Hui, et al. Advances in research on analysis methods and stability of folic acid in food[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2019, 40(5): 446-453.

ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry/-mass spectrometry (UPLC-MS/MS), which can quickly determine different forms of folic acid. Factors affecting the stability of folic acid and measures to increase folic acid intake and stability are explored. It shows that the measures to increase folic acid intake and stability includes adding folic acid in staple crops, packaging folic acid with protein capsule, facilitating the combination of folic acid and protein, etc.

Keywords: food inspection; folic acid; extraction; agricultural products; stability

叶酸(folic acid, folate, FA), 化学名为蝶酰谷氨酸(pteroylglutamic acid, PGA), 是蝶啶系列衍生物的总称, 属于水溶性 B 族维生素。叶酸作为甲基供体参与了许多重要的生物化学反应过程, 特别在维生素 B₁₂ 和维生素 B₆ 合成、修复, 以及嘌呤嘧啶和甲基化 DNA 的合成等方面发挥着重要作用^[1-3]。缺乏叶酸会引起诸多健康问题, 如新生儿神经管畸形、癌症、心血管疾病、巨幼红细胞贫血、动脉硬化、急性心肌梗塞和脑中风等^[4]。叶酸作为人体的必须营养成分之一, 却不能在人体内合成, 需通过日常饮食来摄入^[2]。而日常食品中叶酸含量较低, 又容易在加工过程中损失, 所以, 普遍存在叶酸摄入不足的问题, 中国北方是叶酸的重缺乏区^[4-5]。

世界卫生组织 WHO 建议正常成年人的每日叶酸(游离态)摄入量为 200 μg, 孕妇和乳母为 400 μg。为提高叶酸的日常摄入量, 可选用叶酸含量丰富的食物, 如: 绿叶蔬菜、豆类、谷类、柑橘类水果、坚果、肝脏等; 也可在主粮中添加叶酸。摄入叶酸须有科学的指导, 才能安全有效, 这就迫切需要开展不同方向的分析方法研究, 例如: 分析测定各类食物中叶酸的存在形式及其含量, 监测添加到谷物中的叶酸剂量是否符合标准等。鉴于食品中化学成分复杂(含大量蛋白质、淀粉、多糖等), 对其中叶酸定性定量的测定难度较大; 而且叶酸本身的稳定性差, 容易受到光、热、pH 值等因素的影响, 而造成定量分析不准确。本文针对叶酸分析过程中, 样品的预处理、分析方法、影响叶酸稳定性因素等方面进行综述, 以期获得更高效的分析方法, 为进一步开展食品中叶酸的深入研究提供参考。

1 食品中的叶酸

1.1 叶酸的结构

叶酸具有复杂的分子结构(见图 1), 由蝶啶(Pteridine)、对氨基苯甲酸(*p*-Aminobenzoate)和谷氨酸链(Glutamyl chain)3 部分组成。其中: 在植物和细菌中叶酸合成步骤相同, 涉及 3 个亚细胞结构。蝶啶在细胞质中合成, 对氨基苯甲酸在叶绿体中合成, 随后二者被转入线粒体中形成二氢蝶酸, 再与谷氨酸作用, 逐渐形成单尾或多尾叶酸^[6]。如表 1 所示, 依据不同的取代基—R₁, —R₂, 可形成不同的叶酸衍生物。例如: 当取代基—R₁, —R₂ 分别是—CH₃, —H 时, 则分子式为 5-CH₃H₄PteGlu (5-甲基四氢叶酸), 它是叶酸的主要衍生物。

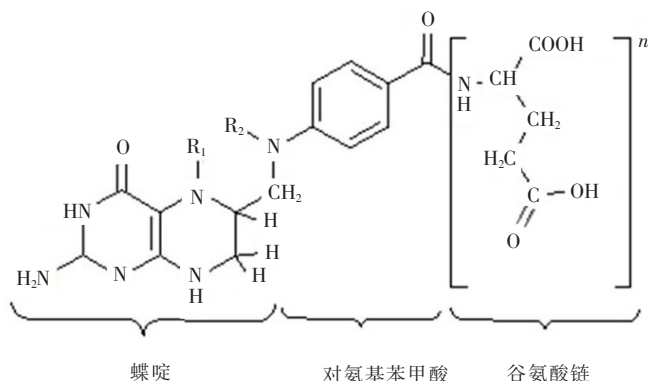


图 1 叶酸分子结构

Fig.1 Molecular structure of folic acid

表 1 叶酸的衍生物

Tab.1 Folic acid derivative

取代基—R ₁	取代基—R ₂	衍生物
—H	—H	四氢叶酸
—CH ₃	—H	5-甲基四氢叶酸
—CHO	—H	5-甲酰四氢叶酸
—HC=NH	—H	5-甲酰四氢叶酸
—H	—CHO	10-甲酰四氢叶酸
—CH ₂ —	—CH ₂ —	5,10-甲基四氢叶酸
=CH—	=CH—	5,10-亚甲基四氢叶酸

1.2 常见食品中的叶酸

增加叶酸日常摄入量的途径主要包括:1)增加富含叶酸的食物比例;2)提高叶酸强化食品的供给;3)使用叶酸补充剂等。此外,美国、加拿大等发达国家已经开始执行强制性的谷物叶酸强化补充政策^[6-7]。

天然叶酸存在于蔬菜、水果、谷物、豆类、乳制品等食物中,其叶酸含量见表2。由表2可知,豆类的叶酸含量最为丰富;小麦的叶酸含量较低;大部分大米的叶酸含量也较低。此外,菠菜、萝卜、青菜、芹菜等蔬菜中的叶酸含量较为丰富,是叶酸的主要膳食来源。值得注意的是,过量摄入叶酸也可能会引起健康风险,如增加前列腺癌发生的风险,掩盖维生素 B₁₂ 缺乏症等^[8]。

表2 常见食品中的叶酸含量

Tab.2 Folic acid content in common foods

种类	食物名称	$w(\text{叶酸})/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	种类	食物名称	$w(\text{叶酸})/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$
谷物	大米(白色、短粒)	2.31	蔬菜	葛粉	3.38
	米糠(粗粮)	0.63		海藻、裙带菜	1.96
	大米(棕色、长粒)	0.23		菠菜	1.94
	大米(白色、长粒)	0.08		萝卜、青菜	1.94
	燕麦	0.56		芹菜	1.59
	黑麦谷物	0.38		欧芹	1.52
	小麦	0.38	香料和 草药	月桂叶	1.80
	高粱谷物	0.20		薄荷	1.14
				迷迭香	1.09
水果	鳄梨	0.89	豆类	留兰香	1.05
	番石榴	0.49		豇豆	6.39
	芒果	0.43		绿豆	6.25
	橘子	0.39		红豆	6.22
	石榴	0.38		鹰嘴豆	5.57
	木瓜	0.37	扁豆	4.79	
	猕猴桃	0.34	乳制品和 豆制品	蛋(蛋黄)	1.46
	黑莓	0.25		奶酪(布里干酪)	0.65
	草莓	0.24		鸡蛋	0.47
	菠萝蜜	0.24		酸奶	0.12
	覆盆子	0.21			

注:数据来源于美国农业部(U.S. Department of Agriculture)(2016)^[9]。

2 食品中叶酸的提取

叶酸的提取是分析检测食品中叶酸的关键和前提。食品中的叶酸含量低,对化学和物理条件敏感,只有经过正确的样品前处理才能最大程度地将叶酸及其衍生物提取出来。

在叶酸提取过程中,为减少氧的影响,需添加抗氧化剂,保护叶酸免受氧化并减少叶酸衍生物之间的相互转化^[10]。抗坏血酸盐作为一种抗氧化剂,常在中性或碱性条件下使用,且常与巯基乙醇或二硫苏糖醇配合使用^[11]。为避免光的影响,建议采用棕色容器或包裹避光材料,以防止叶酸降解。

一般采用化学法或酶解法来提取食品中的叶酸。化学法主要利用叶酸易溶于中性或碱性溶液的特性进行提取,如热沸偏磷酸提取法^[12],常用的浸提液有磷酸缓冲液^[13]、HCl 和三氯乙酸溶液^[14]、NaOH 溶液^[15]、乙酸铵(pH 值为 7.9)缓冲液^[16]等。该方法常与加热、超声波等相结合,不仅有助于细胞溶解,还会使蛋白质变性,释放结合态叶酸。邵丽华等^[13]比较了恒温水浴法和超声波振荡法的叶酸提取效果,认为恒温水浴法优于超声波振荡法。有研究者提出,加热时间不宜过长,否则会导致叶酸降解,特别是在酸性条件下,表现更为明显^[17]。化学法提取叶酸,还应注意 γ -谷氨酰水解酶(GGH)对聚谷氨酰叶酸的水解。该酶在植物中普遍存在,可在提取过程中将多谷氨酰基水解成单戊酰基或短链谷氨酰基形式。WANG 等^[16]在研究含有不同个数谷氨酸链的 5-甲基四氢叶酸时,利用蒸汽处理蔬菜样品,可使 GGH 快速失活。

豆类、谷物等食品中富含淀粉、蛋白质等,常采用酶解法来提取其中的叶酸。酶解法就是利用蛋白酶、淀粉酶等联合处理样品,使与蛋白质、淀粉等相结合的叶酸充分水解,可使各种形式的叶酸转变成单谷氨酸叶酸或 2~3 个谷氨酸尾的叶酸^[18-19]。HEFNI 等^[7]在谷物、小扁豆和豆类等研究中,比较了蛋白酶、淀粉酶等单独使用以及与多种酶联合使用的效果,发现多种酶联合使用可提高叶酸的提取率。

3 叶酸的检测分析方法

叶酸的检测分析方法很多,常见的有微生物法、荧光分析法、液相色谱法(HPLC)等。

3.1 微生物法

微生物法是应用最广的检测方法,由于叶酸也是某些微生物生长所必需的营养物质,将菌液接种至含有叶酸试样液的培养液中,培养一段时间后测定其透光率(吸光度值),可据此确定叶酸的含量。

GB 5009.211—2014《食品中叶酸的测定》^[20]将鼠李糖乳杆菌(*L.rhamnosus*)(ATCC 7469)作为测定用菌。目前,国外在检测蔬菜、豆类、面包等食品中的叶酸时,测定用菌也采用鼠李糖乳杆菌^[21-23]。

微生物法灵敏度高、结果准确,但操作复杂、试验周期较长、菌种传代保存比较繁琐,所测定的结果为叶酸总含量,不能反映叶酸不同衍生物的细节。目前,可采用试剂盒微生物法测定叶酸,扬长避短,方便快捷。

3.2 荧光分析法

荧光分析法的原理是叶酸结构中的吡嗪-嘧啶环具有特殊的吸收光谱,在紫外线照射下产生蓝色荧光,其荧光强度和叶酸浓度成正比。叶酸本身荧光较弱,需加入某些强氧化剂(过硫酸钾($K_2S_2O_8$)、高碘酸钾(KIO_4)、高锰酸钾($KMnO_4$)、Fenton 试剂等)将其氧化,氧化后产物的荧光强度大大增加,这就是间接荧光法。

王梦等^[24]以 $KMnO_4$ 作为氧化剂,用荧光法测定了苹果、梨、菠菜等果蔬中的叶酸含量。同时,郭秀珠等^[25]和迟晓星等^[26]也以 $KMnO_4$ 作氧化剂,先后用荧光分光光谱法和间接荧光法测定了蔬菜中的叶酸含量。苏文斌^[27]则采用 Fenton 试剂作为氧化剂,用间接荧光法测定了果蔬中的叶酸含量,发现 Fenton 试剂产生的羟自由基可将叶酸氧化为蝶呤-6-羧酸,其荧光值较叶酸的荧光值大大增强。

荧光分析法具有测定快速、灵敏、选择性好、仪器简单等优点。

3.3 液相色谱法

目前,常利用液相色谱法、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)来测定食品中叶酸的含量。该方法具有结果精确、操作步骤简单、分析速度快、分离效果理想等特点。采用 HPLC 和 LC-MS 测定食品中叶酸的色谱条件,因研究对象不同、所用仪器不同,存在较大差异。色谱柱一般为 C_{18} 柱,洗脱液差异较大,采用 HPLC 时多为乙腈和磷酸缓冲液,采用 LC-MS 时多为乙腈和甲酸水溶液,详情见表 3。

常采用液相色谱-质谱联用法(LC-MS)分析不同形式叶酸的含量及其变化。PAWLOSKY 等^[34]比较了 LC-MS 法和微生物法之间的差异,认为 LC-MS 法的准确度、重复性均高于微生物法,且能测定不同形式的叶酸。同时,高效液相色谱-质谱联用法的灵敏度更高,蔡建^[35]在运动饮料的叶酸研究中,通过优化 LC-MS 色谱条件、质谱条件、提取剂等,检出限可达到 $0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.4 其他方法

除微生物法、荧光检测法、液相色谱法用于叶酸的检测外,还有伏安法、酶联免疫反应方法(ELISA)等。

JAMALI 等^[37]用磷酸盐缓冲液(pH 值为 7.0)和 2-巯基乙醇浸泡提取样品,然后以一种新型纳米合金(Pt:Co)室温离子液体 RTIL 修饰的碳糊电极作为高灵敏传感器,采用伏安法测定了食品中的叶酸,线性响应范围为 $1.0 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-4} \text{ mol}/\text{L}$,检出限为 $4.0 \times 10^{-8} \text{ mol}/\text{L}$,并成功应用于其他食品样品中叶酸的测定。张娟等^[38]利用差示脉冲溶出伏安技术和叶酸在电极表面的吸附特性,建立了测定痕量叶酸的电化学分析方法,用于小米和玉米中微量和痕量叶酸的测定,其线性范围为 $6.78 \times 10^{-10} \sim 12.27 \times 10^{-8} \text{ mol}/\text{L}$ 。

李贞^[39]和李江等^[40]用 ELISA 方法分别检测了牛奶和奶粉中的叶酸含量。李贞^[39]用竞争性酶联免疫、棋盘法确定最佳抗体包被条件、封闭条件、酶标抗原浓度等,并进行了性能评价测定,此方法的最低检测限为 $2.22 \text{ ng}/\text{mL}$ 。李江等^[40]以奶粉为试材,选择叶酸检测试剂盒,建立了一种检测奶粉中叶酸的酶联免疫分析方法。

表3 液相色谱法测定食品中的叶酸

Tab.3 Determination of foods folic acid by HPLC

食品名称	检测仪器	色谱柱	洗脱条件	作者
	液相色谱仪 (Varian Vista 5500), UV 检测器 (UV-200)	Spherisorb ODS 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	乙腈和磷酸钾缓冲液 (pH 值为 2.2), 柱温 30 °C, 检测波长 290 nm, 流速 0.5 mL/min	VAHTERISTO 等 ^[28]
	液相色谱仪 (岛津 Shimadzu Series LC-10A), UV 检测器, 荧光检测器	Phenomenex 柱 (250 mm×4.6 mm, 4 μm)	乙腈和磷酸缓冲 (30 mmol/L), 柱温 25 °C, 检测波长 290 nm, 流速 1 mL/min	CZARNOWSKA-KUJAWSKA 等 ^[29]
果蔬	超高效液相色谱仪 (Waters Acquity UPLC), 三重四级杆质谱仪 (Waters Quattro Ultima)	Sunfire C ₁₈ 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm)	甲酸 (0.1%; 体积分数) 水溶液和乙腈, 柱温 25 °C, 流速 1.8 mL/min。质谱条件: 电喷雾正离子模式, 电喷雾电压 3.2 kV, 离子源温度 110 °C, 辅助气压力 3×10 ⁻³ mbar (0.3 Pa), 气体流速 1.83 L/min, 加热温度 400 °C, 扫描模式选择反应模式 (SRM)	WANG 等 ^[16]
	液相色谱仪 (岛津 LC-20A), UV 检测器 (SPD-20A)	C ₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)	甲醇和磷酸溶液 (0.1 mol/L, pH 值为 6.5), 柱温 35 °C, 检测波长 280 nm, 流速 1.2 mL/min	周恒勇等 ^[30]
	液相色谱仪 (安捷伦 1100), 荧光检测器 (G1321)	C ₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 3 μm)	磷酸盐缓冲液 (pH 值为 2.3) 和乙腈, 柱温 23 °C, 检测波长 290 nm, 流速 0.4 mL/min	HEFNI 等 ^[7]
	液相色谱仪 (Waters), UV 检测器	C ₁₈ 柱 (150 mm×46 mm, 5 μm)	V(甲醇): V(HAc-NaAc 缓冲液 (pH 值为 5.2)): V(三乙胺) 为 40:60:0.03, 柱温 25 °C, 检测波长 254 nm, 流速 1 mL/min	陈晓熠 ^[31]
谷物	高效液相色谱仪 (安捷伦 1290), 质谱仪 (安捷伦 6460 三级四重杆质谱仪)	HILIC 柱 (4.50 mm×100 mm, 2.6 μm)	V(乙酸铵 (10 mmol/L, 0.2% 乙酸)): V(乙腈) 为 50:50, 柱温 25 °C, 流速 0.8 mL/min。质谱条件: 电喷雾正离子 (ESI+) 模式, 电喷雾电压 3.50 kV, 辅助气压力 50 psi (344.75 kPa), 气体流速 10.0 L/min, 加热温度 300 °C; 多离子监测模式 (MRM)	戴金凤等 ^[32]
	超高压液相色谱仪 (Waters Acquity UPLC), 质谱仪 (Thermo TSQ Quantum)	Waters HSS T ₃ 柱 (150 mm×2.1 mm, 1.86 μm)	0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸-乙腈溶液, 柱温 30 °C, 流速 0.3 mL/min。质谱条件: 电喷雾正离子 (ESI+) 模式, 离子源温度 600 °C, 电喷雾电压 3 500 V, 扫描模式为多离子监测模式 (MRM)	JHA 等 ^[33]
强化面包	液相色谱仪 (Hewlett Packard 1100), 质谱仪 (Finnigan LCQ)	C ₁₈ 柱 (150 mm×46 mm, 5 μm)	V(乙腈): V(水): V(甲醇 (0.1% 甲酸和 0.1% 巯基乙醇)) 为 26:60:14, 柱温 25 °C, 流速 0.175 mL/min	PAWLOSKY 等 ^[34]
饮料	超高效液相色谱仪 (Waters Acquity UPLC), 三重四级杆质谱仪 (Waters Xevo TQ-S)	Waters Atalantis T ₃ 柱 (2.1 mm×150 mm, 3 μm)	甲酸水溶液 (0.1%) 和甲醇水溶液 (10.0%), 柱温 30 °C, 流速 0.2 mL/min。质谱条件: 喷雾电压 3 000 V, 离子源温度 500 °C, 氮气流量 15 L/min, 扫描停滞时间 40 ms	蔡建 ^[35]
保健品	高效液相色谱仪 (岛津 LC-20A), 检测器 (M20A 二极管阵列检测器)	Thermo Synchronis C ₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm)	乙腈和磷酸溶液体积比为 10:90, 柱温 30 °C, 检测波长 285 nm, 流速 1 mL/min	董娇等 ^[36]

4 叶酸的稳定性研究

4.1 影响叶酸稳定性的因素

叶酸性质不稳定,其主要影响因素包括光、热、pH 值等^[1,4,6]。1)光照:在对叶酸和其他 3 种含蝶啶的分子进行的稳态光物理研究中,测定了 pH 值对其荧光量子产量、寿命、发射光谱和激发光谱的影响,结果表明叶酸在酸性和碱性介质中都有非常低的荧光量子产量,但与酸性介质相比,碱性介质的荧光发射光谱呈现出与 pH 值相关的红移现象。众所周知,紫外光可以降解叶酸,并且纯溶液在光照条件下损失得很快。2)热效应:据报道^[1,6],正常储存条件下(20 °C 和 65%的湿度),叶酸以每年 1%的速度分解。在 100 °C 下保存 2 h,叶酸损失率为 8%~25%。3)pH 值:通过研究不同 pH 值下叶酸在水溶液中的变化发现,在 pH 值为 1 时,叶酸可完全降解;在 pH 值为 3 时,叶酸部分降解(40%~45%);在 pH 值为 4~12 时,叶酸降解率低(10%~30%)。此外,氧、电子束等均对叶酸的稳定性有一定的影响。

4.2 提高食品中叶酸含量的措施

为确保植物性食品可以提供足够量的叶酸,许多研究者正努力寻找各种方法来提高食品中叶酸的含量。美国食品和药物管理局(FDA)规定所有富含谷物的产品都要加入叶酸^[41]。玉米面粉是许多西班牙裔群体的主要食物来源,可制成各种玉米食品。玉米经过传统的研磨或烘烤等环节,被加工成玉米粉、玉米饼和薯片后,添加的叶酸仅有 20%得以保留^[41]。ADOLPHSON 等^[42]对玉米成品中叶酸在保存期内的稳定性进行了评估,认为在加工成玉米粉圆饼或其他产品前,在高温条件下长时间保持湿润的强化玉米粉,由于热化学降解作用,会造成叶酸的损失。ARIYARATHNA 等^[43]使用从鹰嘴豆中分离出来的蛋白质形成蛋白质胶囊,包裹叶酸形成微胶囊结构,以此来提高叶酸的热稳定性。在蛋白质基质中,通过包裹叶酸可有效防止其在储存或加工过程中被降解,并提高了其生物利用率^[44]。

为提高叶酸的稳定性,PUTHUSSERI 等^[45]用水杨酸处理香菜叶片,观察到叶片的叶酸含量增加;DÍAZ 等^[46]在此基础上用水杨酸处理拟南芥叶片也可使叶酸含量明显增加(约 4 倍),此外,还考查了与叶酸代谢途径有关的 19 个关键基因,其中 7 种用于叶酸的生物合成,7 种用于分解代谢,5 种用于叶酸稳定。GORELOVA 等^[47]在番茄果实和水稻种子中,运用代谢工程技术调控叶酸生物合成基因来增加叶酸的稳定性,但由于其产生的叶酸在植物中易降解,因此还需进一步了解叶酸的分解代谢和维护叶酸稳定的可能机制^[48]。

5 结 语

叶酸分布广泛,但其含量较少,精确测定各类叶酸及其衍生物需建立完备的分析体系。

1)叶酸提取方法一般为化学法和酶解法。测定富含淀粉、蛋白质的豆类、谷物等食品中叶酸时,常采用酶解法,以尽可能将与淀粉、蛋白质等相结合的叶酸水解出来。

2)常见的叶酸检测方法有微生物法、荧光分析法、液相色谱法等。微生物法是一种传统检测方法,但具有一定的局限性,操作复杂,耗时长;荧光分析法常需要使用强氧化剂来提高其灵敏度;液相色谱法具有灵敏度高、检测准确等优点,在不同果蔬、谷物等的检测过程中得到了广泛应用。特别是 LC-MS, LC-MS/MS, UPLC-MS/MS 的应用,灵敏度更高,测定的叶酸衍生物种类更为丰富。

3)叶酸的性质不稳定,影响因素较多,其中光、热、pH 值对叶酸稳定性的影响较大。在叶酸分析检测过程中应注意避光、添加抗氧化剂、使用碱性或中性浸提液等。人们可通过在主粮作物中添加叶酸、蛋白质胶囊包裹叶酸、促进叶酸与蛋白质结合等方式,提高叶酸的摄入量及其稳定性。

总之,由于食品成分复杂、叶酸性质不稳定,对叶酸的精确、稳定检测会比较困难。随着现代分析检测技术的不断发展,为精确检测食品中叶酸的含量以及全面确认叶酸的存在形式提供了可能。谷物、玉米、小麦等作为中国的主粮作物,是人们摄入天然叶酸的主要来源。因此,通过优化样品前处理体系,建立精确的食品中叶酸的检测分析方法,可促进对叶酸的多方面、深层次研究,具有重要的现实意义。

参考文献/References:

- [1] GAZZALI A M, LOBRY M, COLOMBEAU L, et al. Stability of folic acid under several parameters [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 93(10):419-430.

- [2] BOURASSA P, HASNI I, TAJMIR-RIahi H A. Folic acid complexes with human and bovine serum albumins[J]. Food Chemistry, 2011, 129(3): 1148-1155.
- [3] TYAGI K, UPADHYAYA P, SARMA S, et al. High performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry for profiling and quantitative analysis of folate monoglutamates in tomato[J]. Food Chemistry, 2015, 179(7):76-84.
- [4] SAINI R K, NILE S H, KEUM Y S. Folate: Chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability[J]. Food Research International, 2016, 89(11):1-13.
- [5] STEUR H D, GELLYNCK X, STOROZHENKO S, et al. Health impact in China of folate-biofortified rice[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(6): 554-556.
- [6] HANSON A D, GREGORY J F. Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2011, 62(1): 105-125.
- [7] HEFNI M, ÖHRVIK V, TABEKHA M, et al. Folate content in foods commonly consumed in Egypt[J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 540-545.
- [8] WIEN T N, PIKE E, WISLOFF T, et al. Cancer risk with folic acid supplements: A systematic review and meta-analysis[J]. British Medical Journal, 2012, 2(1): e000653.
- [9] United States Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference Release[DB/OL]. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/nutrients/index,2019-06-13>.
- [10] LEE J E, CHAN A T. Fruit, vegetables, and folate: Cultivating the evidence for cancer prevention[J]. Gastroenterology, 2011, 141(1): 16-20.
- [11] STRANDLER H S, PATRING J, JÄGERSTAD M, et al. Challenges in the determination of unsubstituted food folates: Impact of stabilities and conversions on analytical results[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63(9): 2367-2377.
- [12] 郭丽琼,曹秋旭,吴厚玖.果蔬中叶酸分析方法研究的进展[J].食品工业科技, 2012,33(10):402-406.
GUO Liqiong, CAO Qiuxu, WU Houjiu. Research progress of folic acid analysis in fruit and vegetable[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(10): 402-406.
- [13] 邵丽华,王莉,白文文,等.山西谷子资源叶酸含量分析及评价[J].中国农业科学,2014,47(7):1265-1272.
SHAO Lihua, WANG Li, BAI Wenwen, et al. Evaluation and analysis of folic acid content in millet from different ecological regions in Shanxi province[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(7): 1265-1272.
- [14] 秦立俊.间接荧光法和间接原子吸收光谱法测定叶酸[D].上海:同济大学,2006.
QIN Lijun. Determination of Folic Acid by Indirect Fluorescence Method and Indirect Atomic Absorption Spectrometry [D]. Shanghai: Tongji University, 2006.
- [15] 李富兰,颜杰,郭金全,等.蚕沙中叶酸的提取与分析检测[J].食品科技,2009,34(10):211-213.
LI Fulan, YAN Jie, GUO Jinqian, et al. Extraction and analysis of silkworm folic acid [J]. Food Science and Technology, 2009,34(10): 211-213.
- [16] WANG C, RIEDL K M, SCHWARTZ S J. A liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for quantitative determination of native 5-methyltetrahydrofolate and its polyglutamyl derivatives in raw vegetables[J]. Journal of Chromatography B, 2010, 878(29): 2949-2958.
- [17] DOHERTY R F, BEECHER G R. A method for the analysis of natural and synthetic folate in foods[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2003, 51(2): 354-361.
- [18] QUINLIVAN E P, HANSON A D, GREGORY J F. The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples[J]. Analytical Biochemistry, 2006, 348(2): 163-184.
- [19] ZHANG H, JHA A B, WARKENTIN T D, et al. Folate stability and method optimization for folate extraction from seeds of pulse crops using LC-SRM MS[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2018, 71(4):44-55.
- [20] GB 5009.211—2014,食品中叶酸的测定[S].
- [21] FAJARDO V, ALONSO-APERTE E, VARELA-MOREIRAS G. Folate content in fresh-cut vegetable packed products by 96-well microtiter plate microbiological assay[J]. Food Chemistry, 2015, 169(2): 283-288.
- [22] SAMANIEGO-VAESKEN M D L, ALONSO-APERTE E, VARELA-MOREIRAS G. Analysis and evaluation of voluntary folic acid fortification of breakfast cereals in the Spanish market[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2010, 23(5): 419-423.
- [23] FAJARDO V, ALONSO-APERTE E, VARELA-MOREIRAS G. Total folate content in ready-to-eat vegetable meals from the Spanish market[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2017, 64(10): 223-231.
- [24] 王梦,张加玲.荧光法测定果蔬中叶酸含量的研究[J].中国食物与营养,2016,22(3):40-42.
WANG Meng, ZHANG Jialing. Determination of folic acid content in fruits and vegetables by fluorescence method[J]. Food and Nutrition in China, 2016, 22(3): 40-42.
- [25] 郭秀珠,黄品湖,雷海清,等.果蔬中叶酸的提取分离及测定方法研究[J].食品科学,2006,27(3):183-185.
GUO Xiuzhu, HUANG Pinhu, LEI Haiqing, et al. Study on the extraction purifying and measuring method of the folacin in fruits and vegetables[J]. Food Science, 2006, 27(3): 183-185.
- [26] 迟晓星,张涛,赵静,等.叶酸的提取及抗氧化性研究[J].现代食品科技,2011,27(10):1234-1237.

- CHI Xiaoxing, ZHANG Tao, ZHAO Jing, et al. Study on extraction conditions and antioxygenic activity of folic acid[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2011, 27(10): 1234-1237.
- [27] 苏文斌. Fenton 试剂氧化-荧光分析法测定果蔬中叶酸的含量[J]. *食品科学*, 2011, 32(4): 212-215.
SU Wenbin. Fluorimetric determination of folic acid in vegetable samples using fenton reagent as oxidant[J]. *Food Science*, 2011, 32(4): 212-215.
- [28] VAHTERISTO L, LEHIKONEN K, OLLILAINEN V, et al. Application of an HPLC assay for the determination of folate derivatives in some vegetables, fruits and berries consumed in Finland[J]. *Food Chemistry*, 1997, 59(4): 589-597.
- [29] CZARNOWSKA-KUJAWSKA M, GUJSKA E, MICHALAK J. Testing of different extraction procedures for folate HPLC determination in fresh fruits and vegetables[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2016, 57(4): 64-72.
- [30] 周恒勇, 刘凯政, 刘建文, 等. HPLC-UV 法直接测定蔬菜提取物的叶酸含量[J]. *食品科技*, 2017, 42(8): 284-288.
ZHOU Hengyong, LIU Kaizheng, LIU Jianwen, et al. Quantitative determination of folic acid extracted from vegetables by HPLC-UV directly [J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(8): 284-288.
- [31] 陈晓熠. 甜玉米中水溶性维生素含量的 HPLC 测定法及其动态变化研究[J]. *湖北农业科学*, 2001, 40(6): 31-32.
CHEN Xiaoyi. Determination of water soluble vitamins in sweet corn by HPLC and its dynamic changes [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2001, 40(6): 31-32.
- [32] 戴金凤, 徐明芳, 段翰英, 等. 超高效液相串联质谱测定四棱豆中总叶酸和多聚谷氨酸叶酸的含量[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(10): 295-300.
DAI Jinfeng, XU Mingfang, DUAN Hanying, et al. Determination of total folate content and polyglutamate folate distribution in winged beans using UPLC-MS/MS [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(10): 295-300.
- [33] JHA A B, ASHOKKUMAR K, DIAPARI M, et al. Genetic diversity of folate profiles in seeds of common bean, lentil, chickpea and pea [J]. *Journal of Food Composition & Analysis*, 2015, 42(6): 134-140.
- [34] PAWLOSKY R J, HERTRAMPF E, FLANAGAN V P, et al. Mass spectral determinations of the folic acid content of fortified breads from Chile[J]. *Journal of Food Composition & Analysis*, 2003, 16(3): 281-286.
- [35] 蔡建. 超高效液相色谱-串联质谱法测定运动饮料中的叶酸[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(11): 220-224.
CAI Jian. Determination of folic acid in sports drinks by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2017, 43(11): 220-224.
- [36] 董娇, 曹宁阳, 乔玲, 等. 高效液相色谱法测定保健食品中叶酸条件优化[J]. *农业科技与装备*, 2017, 277(7): 52-53.
DONG Jiao, CAO Ningyang, QIAO Ling, et al. Optimization of folic acid conditions in health foods by high performance liquid chromatography [J]. *Agricultural Science & Technology and Equipment*, 2017, 277(7): 52-53.
- [37] JAMALI T, KARIMI-MALEH H, KHALILZADEH M A. A novel nanosensor based on Pt:Co nanoalloy ionic liquid carbon paste electrode for voltammetric determination of vitamin B₉ in food samples[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 57(2): 679-685.
- [38] 张娟, 靳保辉, 刘灵芳, 等. 差示脉冲溶出伏安法测定粮食中叶酸的研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2001, 22(2): 91-94.
ZHANG Juan, JIN Baohui, LIU Lingfang, et al. Determination of folic acid in grain by differential pulse stripping voltammetry [J]. *Journal of Henan University of Technology(Natural Science Edition)*, 2001, 22(2): 91-94.
- [39] 李贞. ELISA 方法检测牛奶中叶酸含量[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(19): 137-141.
LI Zhen. ELISA method for the detection of folate in milk [J]. *Food Research and Development*, 2016, 37(19): 137-141.
- [40] 李江, 严家俊, 暴艳, 等. 酶联免疫法快速检测奶粉中的叶酸[J]. *中国乳品工业*, 2017, 45(10): 37-38.
LI Jiang, YAN Jiajun, QI Yan, et al. Rapid detection of folic acid in milk powder by enzyme linked immunosorbent assay [J]. *China Dairy Industry*, 2017, 45(10): 37-38.
- [41] FLORES A L, CORDERO A M, DUNN M, et al. Adding folic acid to corn Masa flour: Partnering to improve pregnancy outcomes and reduce health disparities[J]. *Preventive Medicine*, 2018, 106(1): 26-30.
- [42] ADOLPHSON S J, DUNN M L, NIEISEN-BARROWS S, et al. Evaluation of bacterial effects on folic acid loss in fortified, nixtamalized corn masa flour[J]. *Cereal Chemistry*, 2016, 93(5): 508-512.
- [43] ARIYARATHNA I R, KARUNARATNE D N. Use of chickpea protein for encapsulation of folate to enhance nutritional potency and stability[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2015, 95(7): 76-82.
- [44] PUTHUSSERI B, DIVYA P, LOKESH V, et al. Enhancement of folate content and its stability using food grade elicitors in coriander (*Coriandrum sativum* L.)[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2012, 67(2): 162-170.
- [45] PUTHUSSERI B, DIVYA P, VEERESH L, et al. Evaluation of folate-binding proteins and stability of folates in plant foliages[J]. *Food Chemistry*, 2018, 242(3): 555-559.
- [46] DÍAZ D L G, GREGORY J F, HANSON A D. Folate biofortification of tomato fruit[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(10): 4218-4222.
- [47] GORELOVA V, AMBACH L, RÉBEILLÉ F, et al. Foliates in plants: Research advances and progress in crop biofortification[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2017, 5(3): 1-20.
- [48] ZEMA P, PILOSOFF A M R. On the binding of folic acid to food proteins performing as vitamin micro/nanocarriers[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 79(6): 509-517.