样品前处理对检测柑橘中5-甲基四氢叶酸的影响

郭丽琼[1,2]，吴厚玖[1,*]，谈安群[1]，马亚琴[1]，焦晓磊[1,2]
(1.西南大学柑橘研究所，重庆 400712；2.西南大学食品科学学院，重庆 400715)

摘 要：5-甲基四氢叶酸是叶酸的1种衍生物，是叶酸在柑橘中存在的最主要形式。由于其不稳定及柑橘果实成分复杂，导致叶酸的检测较为困难。要准确测定柑橘中5-甲基四氢叶酸的含量，柑橘样品的前处理非常重要。采用高效液相荧光检测法，考察不同的前处理方法对柑橘中5-甲基四氢叶酸检出结果的影响。结果表明：柑橘类样品果肉、果皮、囊衣3g，种子2g匀浆后加入20mL磷酸缓冲液，调解pH值为6.8，沸水浴处理15min(1次水解)，冷却离心取上清液定容至25mL后取3mL，添加0.5mL大鼠血清、37℃振摇温育20h时，可得到最佳检测结果。

关键词：前处理；柑橘；5-甲基四氢叶酸；检测

Effect of Pretreatments on the Measurement of 5-Methyltetrahydrofolate in Citrus

GUO Li-qiong[1,2]，WU Hou-jiu[1,*]，TAN An-qun[1]，MA Ya-qin[1]，JIAO Xiao-lei[1,2]
(1. Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China；
2. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract：The main form of folate, as a polyglutamate derivative of folate, in citrus is 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF). The content of 5-MTHF is difficult to measure due to its instability and the complex matrix in citrus. Pre-treatment of samples is very important for determining 5-MTHF in citrus accurately. In this work, the effect of different pre-treatment methods on the extraction efficiency of 5-MTHF was explored using high performance liquid chromatography-fluorescence detection (RP-HPLC-FLD). The results showed that the best hydrolysis conditions for citrus samples were found as follows: homogenization of samples (3 g of pulp, exocarp plus mesocarp, endocarp or 2 g of seeds) and dilution to 20 mL with phosphate buffer and adjustment of pH to 6.8, heating in a boiling water bath for 15 min (single hydrolysis), dilution of supernatant to 25 mL after cooling down and centrifugation, addition of 0.5 mL of rat serum to 3 mL of the diluted sample, and incubation at 37 ℃ for 20 h with an adjusted pH of 6.8 while shaking.

Key words：pre-treatment；citrus；5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF)；detetermination
中图分类号：TS255.1 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)24-0168-06
doi:10.7506/spkx1002-6630-201324035

叶酸是指含有蝶酰谷氨酸结构的1类维生素，属于水溶性B族维生素复合体之一，主要是由喋啶、对氨基苯甲酸和谷氨酸3部分组成[1-2]。叶酸的主要形式有：二氢叶酸、四氢叶酸、5-甲酰基四氢叶酸或10-甲酰基四氢叶酸或5,10-次甲基四氢叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸和5-甲基四氢叶酸[3-4]。叶酸在天然植物中多以多聚谷氨酸盐的形式存在[5-6]，Gregory等[7]认为植物组织中叶酸最主要存在的形式为5-甲基四氢叶酸及其多聚谷氨酸盐，Wang等[8]报道，果蔬中5-甲基四氢叶酸及其多聚谷氨酸盐含量占其总叶酸含量的50%～90%，故本研究着重测定了柑橘中5-甲基四氢叶酸的含量。

本研究采用的高效液相色谱法只对叶酸的单、双、三谷氨酸盐的形式敏感，处理含有叶酸多聚谷氨酸盐的样品时利用适量的叶酸缀合酶对其进行酶解。Stokstad等[9]认为，橙汁中5-甲基四氢叶酸单谷氨酸盐、四谷氨酸盐和五谷氨酸盐的含量分别占总5-甲基四氢叶酸含量的30%～40%、15%～30%和40%～50%。White等[10]通过反相高效液相电化学检测法测定柑橘汁中5-甲基四氢叶酸的含量结果表明，经叶酸缀合酶处理的样品比没有经过酶解的样品检测出的5-甲基四氢叶酸含量要高30%～70%。但Streiff等[11]认为甜橙含有丰富的叶酸资源，其存在形式为单谷氨酸盐，不需要用叶酸缀合酶降解，因此本实验对于叶酸缀合酶的使用与否及用量进行了研究。

由于5-甲基四氢叶酸稳定性差，遇光、氧气和高温易分解，加之柑橘果实中成分比较复杂，干扰因素多，

收稿日期：2013-01-18
基金项目：公益性行业(农业)科研专项(200903043-6-4)
作者简介：郭丽琼(1986—)，女，硕士研究生，研究方向为农产品加工及贮藏工程。E-mail：guoliqiong815@163.com
*通信作者：吴厚玖(1948—)，男，研究员，研究方向为果蔬加工技术及营养。E-mail：wuhoujiu@126.com

增加了检测5-甲基四氢叶酸的难度[12-13]。因此，本研究主要探讨了样品前处理的方式及如何利用叶酸钴合酶有效提取柑橘中的5-甲基四氢叶酸及其衍生物。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

奥林达夏橙 采自重庆市忠县。

5-甲基四氢叶酸标准品 瑞士Schircks Laboratories公司；大鼠血清、鸡胰腺冻干粉 上海物竞化工科技有限公司；磷酸二氢钾、抗坏血酸、磷酸、醋酸钠 成都科龙化工试剂厂；甲醇、乙腈(均为色谱纯) 美国Sigma公司；2-巯基乙醇 天津市光复精细化工研究所；氢氧化钾 重庆北碚化学试剂厂；氯化钠(分析纯) 重庆川东化工(集团)有限公司。

1.2 仪器与设备

Dionex's Ultimate 3000高效液相色谱仪、荧光检测器 戴安(上海)分析仪器有限公司；Venusil MP C_{18}色谱柱 天津博纳艾杰尔科技有限公司；恒温水浴锅 江苏金坛市中大仪器厂；LDZX-50FBS型立式压力蒸汽灭菌器 上海深谙医疗器械厂；CQ250超声波清洗器 上海超声波仪器厂；IEC CL31R冷冻离心机 德国ThermoFisher公司；SAX固相萃取小柱 上海安谱科学仪器有限公司；2X-2真空泵 南京真空泵厂；0.22μm滤膜 天津津腾实验设备有限公司；FE20 pH计 瑞士Mettler Toledo公司；FAZO04B电子分析天平 上海精科仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液的配制

精确称取5-甲基四氢叶酸标准品2.0mg于100mL容量瓶中，用含1g/100mL抗坏血酸和0.1%(*V*/*V*)2-巯基乙醇的0.1mol/L磷酸二氢钾溶液溶解并定容至刻度，即得20μg/mL的标准储备液。精密量取适量标准储备液，用上述磷酸二氢钾溶液依次配制成不同质量浓度梯度的系列标准溶液，测定各标准液的峰面积，并绘制标准曲线。

1.3.2 柑橘可食部分的前处理方法优化

1.3.2.1 称样

新鲜的夏橙清洗后取其可食部分进行匀浆处理，准确称取果肉3g匀浆后的样品于125mL的三角锥瓶中，精确至0.0001g。加20mL 0.05mol/L磷酸缓冲液(含1%抗坏血酸和0.1% 2-巯基乙醇的磷酸二氢钾溶液)，调节pH6.8并定容至25mL，振摇后进行水解。样品称取及所加缓冲液体积参照GB/T 5009.211—2008《食品中叶酸的测定》[14]。操作过程需在暗光或避光条件下进行，所用器皿需用铝箔锡纸包裹。

1.3.2.2 样品处理条件优化

不同的1次水解方式：将称取好的样品分别进行121℃高压水解、沸水浴处理和超声波水解，分别处理5、10、15、20、30min，并以未进行1次水解样品为空白对照。处理好的样品在4℃、12000r/min、30min的条件下离心，收集上清液，用磷酸缓冲液清洗残渣再次离心，合并2次滤液并定容至25mL。

不同的酶处理方式：样品经上述实验得出的最佳1次水解方式处理后，加入叶酸钴合酶进行酶解。吸取上清液3mL于5mL离心管中，分别加入大鼠血清后于恒温振荡培养箱中温育，为考察不同钴合酶对其作用效果，本实验选择了2种钴合酶，即鸡胰酶和大鼠血清进行比较，并分别考察酶的用量(0.0、0.1、0.3、0.5、0.8、1.0mL)、温育时间(0、4、8、12、16、20、24h)、pH值(5.09、6.03、6.97、8.04、8.96)对5-甲基四氢叶酸检测的影响。

正交试验：考察pH值、酶的用量、温育时间对酶解效果的影响。根据单因素试验结果进行$L_9(3^4)$正交试验，以确定5-甲基四氢叶酸酶解的最佳条件，正交试验因素水平表1。

表1 正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels for orthogonal array design

水平	因素		
	A pH	*B*加酶量/mL	*C*温育时间/h
1	5.2	0.2	16
2	6.0	0.5	20
3	6.8	0.8	24

1.3.2.3 酶解

吸取上清液3mL于5mL离心管中，分别加入0.5mL的大鼠血清后于37℃的恒温振荡培养箱中温育20h，取出后冰水冷却。再次以15000r/min的转速离心20min，收集上清液，以备纯化。

1.3.2.4 纯化

利用SAX固相萃取小柱对萃取液进行纯化，先后用2×2.5mL的甲醇和2×2.5mL的蒸馏水将SAX小柱活化平衡，流速控制在1～2drops/s。吸取2.5mL样品于小柱中，让其缓慢过柱，流速不超过1drops/s。用2×2.5mL的蒸馏水过柱，流速控制在1～2drops/s，以洗去小柱中的杂质。最终用洗脱液将叶酸洗脱下来，流速不超过1drops/s(洗脱液为含有10g/100mL的氯化钠、1g/100mL的抗坏血酸和0.1%(*V*/*V*)2-巯基乙醇的0.1mol/L乙酸钠溶液)。弃掉最初的0.5mL，收集接下来的3.5mL检测[15-16]。

1.3.3 色谱条件

色谱柱：Venusil MP C_{18}柱(250mm×4.6mm，5μm)；流动相：6%(*V*/*V*)乙腈-94%(*V*/*V*)0.05mol/L磷酸二氢钾溶液(pH3.0)；流速1.0mL/min；柱温23℃；进样量20μL；激发波长290nm；发射波长360nm。

1.3.4 柑橘其他部位样品处理方法

利用上述所得最佳处理方式对柑橘样品进行分部位检测。将新鲜果实分离出柑橘果肉、囊衣、果皮、种子4部分，将果肉匀浆、果皮捣碎后分别装在自封袋中，加入液氮使其快速冻结后放入黑色塑料袋中存放于－20℃冰箱贮藏，样品存放不超过14d。分析检测前常温解冻。

果皮、囊衣和种子的处理：准确称取果皮、囊衣3g，种子2g于研钵中，加入液氮进行研磨，用25mL萃取液将样品转移至125mL三角锥瓶中，振荡沸水浴、离心、加酶、温育、离心、纯化等条件下获得提取液，0.22μm滤膜过滤，待测。

1.3.5 回收率实验

分别称取不同部位样品于125mL三角锥瓶中，其中2份作为本底测定，其余3份添加不同含量梯度的5-甲基四氢叶酸标准溶液(3个含量梯度)，每份样品平行测定2次，考察方法的回收率。

回收率/%=($C-A$)/B×100

式中：A为样品中5-甲基四氢叶酸含量/(μg/100g)；B为添加的标准品量/(μg/100g)；C为加标样品的5-甲基四氢叶酸含量/(μg/100g)。

1.4 数据分析

利用Excel和Statistix软件对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

5-甲基四氢叶酸标准溶液在0.003～0.100μg/mL范围内，与其峰面积线性关系良好，R^2＞0.999。

2.2 1次水解方式对5-甲基四氢叶酸水解率的影响

表2 不同的1次水解方式对5-甲基四氢叶酸水解率的影响

Table 2 Effect of different hydrolysis methods on the extraction efficiency of 5-methyltetrahydrofolate

%

处理方式	处理时间/min					
	0	5	10	15	20	30
121℃高压水解	100	128.7	140.3	118.1	108.7	105.6
沸水浴	100	126.1	132.1	144.0	114.8	113.2
超声波处理	100	85.1	95.5	94.4	87.6	78.5

注：以对照组样品测得的5-甲基四氢叶酸含量为100%。以下酶解率同此计算。

如表2所示，121℃高压水解和沸水浴处理，都能促进5-甲基四氢叶酸的水解，尤其沸水浴处理15min时，水解率达到最高，比未经过1次水解处理的检出量高出44.0%。而经过超声波处理的样品，5-甲基四氢叶酸的检出量都比未经过处理的样品低，说明超声波处理不能促进5-甲基四氢叶酸的水解或超声波处理能够促进其水解，但破坏了5-甲基四氢叶酸的结构，导致其含量降低。同时考虑提取率以及操作难易，选用沸水浴处理15min为1次水解条件。

2.3 叶酸轭合酶水解效果比较

2.3.1 叶酸轭合酶种类

样品经所得最佳1次水解方式即沸水浴处理15min后，分别加入大鼠血清和鸡胰酶，于37℃恒温箱振荡温育16h。结果如图1。

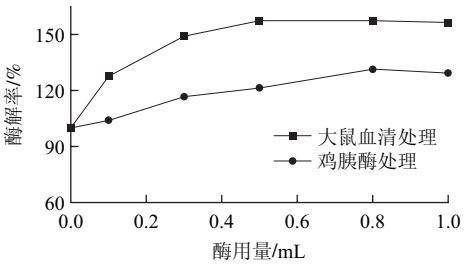


图1 2种叶酸轭合酶效果比较

Fig.1 Comparison of the effectiveness of folate conjugases from two different sources

由图1可知，大鼠血清和鸡胰酶都能够显著提高5-甲基四氢叶酸的检测量(P＜0.05)，在0.5mL的大鼠血清和0.8mL的鸡胰酶使用量条件下，柑橘中5-甲基四氢叶酸的检测量达到最高，其含量分别比空白对照的高57%和31%左右，大鼠血清的轭合效果比鸡胰酶的轭合效果更好。同时由于大鼠血清易购买且使用方便，故选用大鼠血清。此外，对于5-甲基四氢叶酸含量为25μg/100g左右的样品添加0.5mL的大鼠血清比较合适。

柑橘中含有的5-甲基四氢叶酸形式多以多聚谷氨酸盐的形式存在，通过对比酶解前后的5-甲基四氢叶酸含量发现，该酶解条件下，经酶解所测5-甲基四氢叶酸含量比未酶解的检测量高57%，说明奥林达夏橙中含5-甲基四氢叶酸多聚谷氨酸盐为57%左右，与Stokstad[9]、White[10]等的研究结果相似。

2.3.2 温育时间

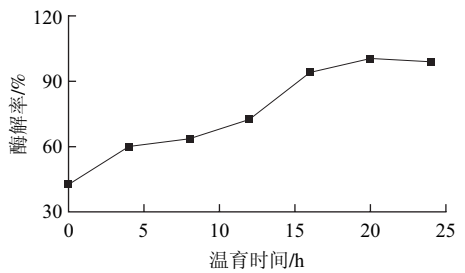


图2 温育时间对5-甲基四氢叶酸含量的影响

Fig.2 Effect of incubation time on the determination of 5-methyltetrahydrofolate

样品经所得最佳1次水解方式即沸水浴处理15min后，加入大鼠血清0.5mL，于恒温培养箱中振荡培养后检

测5-甲基四氢叶酸的含量。以检测的5-甲基四氢叶酸最高含量为100%计，结果见图2。

由图2可知，随着温育时间的延长，5-甲基四氢叶酸的检测量逐渐升高，在温育16h时，5-甲基四氢叶酸的检测量达到了83%以上，20h时效果达到最佳，得到最大检测量；而温育24h和20h时所得结果没有显著差异($P<0.05$)，故将温育时间选在20h。

2.3.3 pH值

样品经沸水浴处理15min、调节pH值、加入大鼠血清0.5mL、振荡温育20h后，检测5-甲基四氢叶酸的含量，结果如图3所示。

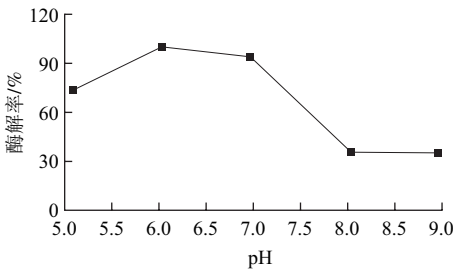


图3 pH值对5-甲基四氢叶酸含量的影响

Fig.3 Effect of pH on the determination of 5-methyltetrahydrofolate

由图3可知，以检测的5-甲基四氢叶酸最高含量为100%，酶解效率最高的pH值为6.03，在pH6.97时，5-甲基四氢叶酸含量为最高时的94%，而pH值在8和9左右时，酶解率明显降低，只有34%。说明大鼠血清中所含的叶酸轭合酶在pH6.03～6.93之间时活性最大。

2.3.4 叶酸轭合酶水解条件的正交试验

表3 正交试验结果

Table 3 Orthogonal array design and results

试验号	*A*	*B*	*C*	*D*空列	5-甲基四氢叶酸含量/(μg/100g果肉)
1	1	1	1	1	14.39
2	1	2	2	2	16.88
3	1	3	3	3	17.68
4	2	1	2	3	16.94
5	2	2	3	1	19.12
6	2	3	1	2	17.23
7	3	1	3	2	23.39
8	3	2	1	3	24.65
9	3	3	2	1	22.37
k_1	16.317	18.240	18.757	18.627	
k_2	17.763	20.217	18.730	19.167	
k_3	23.470	19.093	20.063	19.757	
R	7.153	1.977	1.333	1.130	

由表3可知，3种考察因素对5-甲基四氢叶酸的提取量都有影响，最优组合为8号，即$A_3B_2C_1$；而从*k*值可以得出最优组合为$A_3B_2C_3$。根据*R*值所得因素影响的主次顺序为$A>B>C$，故确定*A*因素即萃取液的pH值为最重要的因素，其次为酶的用量，最后为温育时间。温育时间的单因素试验表明在温育20h和24h没有显著差异，在能达到相同酶解效果的前提下，选择较短温育时间即20h为实际操作条件；故最终确定最佳酶解条件为：pH6.8，加0.5mL的大鼠血清，温育时间为20h。

2.4 加标回收率

表4 柑橘各部位样品的加标回收率

Table 4 Recovery of 5-methyltetrahydrofolate from spiked samples of various tissues of citrus

项	果肉	囊衣	果皮	种子
平均回收率/%	101.88	90.39	89.44	93.17
相对标准偏差/%	2.62	3.13	3.83	2.67

取柑橘果肉、果皮、囊衣和种子，按1.3.4及1.3.5节处理。结果表明：果肉样品的平均回收率为101.88%，相对标准偏差为2.62%；囊衣样品的平均加标回收率为90.39%，相对标准偏差为3.13%；果皮样品的平均加标回收率为89.44%，相对标准偏差为3.83%；种子样品的平均加标回收率为93.17%，相对标准偏差为2.67%。结果表明该检测方法基本能够满足柑橘不同部位5-甲基四氢叶酸的检测，是可靠的。

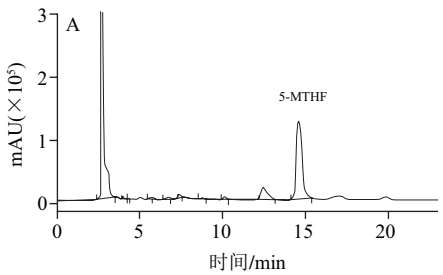
2.5 柑橘各部位5-甲基四氢叶酸含量

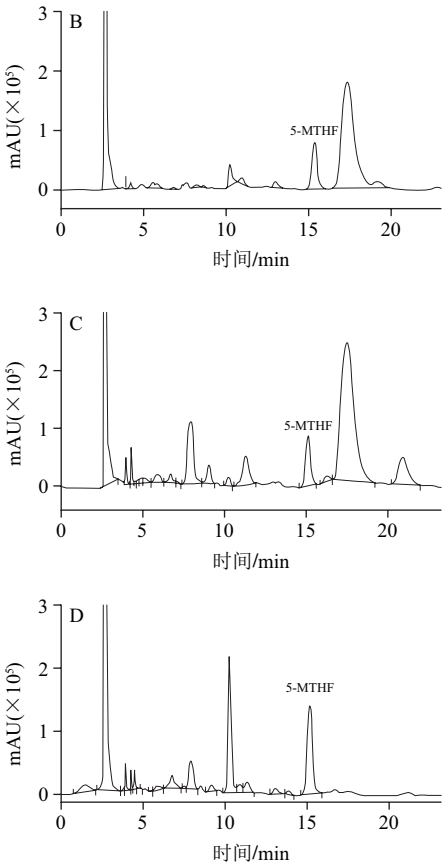
表5 柑橘各部位5-甲基四氢叶酸的含量

Table 5 Contents of 5-methyltetrahydrofolate in various tissues of citrus

项	果皮/(μg/100g)	果肉/(μg/100g)	囊衣/μg/100g)	种子/(μg/100g)
1	11.76	24.15	25.36	50.36
2	12.98	24.68	24.14	48.97
3	11.25	24.91	26.04	49.58
平均值	12.00	24.58	25.18	49.64
相对标准偏差/%	7.41	1.58	3.82	1.40

由表5可知，奥林达夏橙中果皮中的5-甲基四氢叶酸含量最低，只有12μg/100g；果肉和囊衣中的含量相近，分别为24.58、25.18μg/100g；种子中含量最高，为49.64μg/100g。Vahtersto等[17]报道，甜橙可食部分检测出的5-甲基四氢叶酸含量为27μg/100g，而Martin等[18]通过高效液相色谱-质谱联用法测定出甜橙中的5-甲基四氢叶酸的含量为44μg/100g。本实验测得奥林达夏橙中5-甲基四氢叶酸的含量与上述两者的研究结果有所差别，但就可食部分而言，与Vahtersto等[17]测定的结果接近，这与实验所用方法、原料种类和产地、种植环境及其培养方式等有关。





A.果肉；B.囊衣；C.果皮；D.种子。

图4 柑橘各部位样品色谱图

Fig.4 Chromatograms of various tissues of citrus

3 结 论

由于天然植物中叶酸多以蝶酰多聚谷氨酸盐的形式存在，即便是以单谷氨酸盐形式存在，也常是多种衍生物共存，所以在测定时必须用叶酸轭合酶对进行降解，以得到液相色谱敏感的形式。同时由于多数样品含有丰富的蛋白质和淀粉，会与叶酸结合使其不能完全水解，故需利用轭合酶、蛋白酶和淀粉酶3种酶联合处理样品，蛋白酶、淀粉酶可释放包裹于蛋白、淀粉之间或与蛋白结合的叶酸，能够大大提高叶酸的水解率，有利于样品检测。但在本研究中，由于柑橘样品中含有的蛋白质和淀粉很少，故只用了叶酸轭合酶对样品进行处理[19-20]。

目前国际上常采用的叶酸轭合酶有鸡胰酶、大鼠血清和猪肾酶等，根据实验条件和样品来源的方便性，本研究选择了鸡胰酶和大鼠血清，比较2者实验效果，表明大鼠血清的效果更佳。

此外，对于大鼠血清用量的选择，Hefni等[21]在测定果蔬样品中各叶酸衍生物含量时，在3mL萃取液中添加0.1mL大鼠血清，而在本研究中，考察0～1.0mL的用量，结果表明在添加0.5mL大鼠血清时能达到最佳的水解效果。这可能与实验原料品种和大鼠血清的来源及其贮藏时间等因素有关。

根据Arcot等[22]的报道，大鼠血清在pH7.0时具有最大的活性和稳定性，同时结合5-甲基四氢叶酸在萃取液的稳定性，选取pH6.8作为最佳酶解条件。

最佳温育时间可能与实验原料的种类及基质成分有关。选用鸡胰酶作为轭合酶时，多选择温育时间16～20h[14]；而使用大鼠血清作叶酸轭合酶来源时，多数研究者[16,21,23-25]采用的温育条件为37℃条件下分别温育过夜、1、2h或3h。在这些文献中都没有对大鼠血清的用量、温育时间及效果进行筛选和比较，因此本实验对叶酸轭合酶的用量、温育时间及效果进行了研究，发现选用大鼠血清作为叶酸轭合酶来源时，在37℃条件下温育20h效果最佳，5-甲基四氢叶酸的水解率得到显著提高。这可能是由于在pH6.8的环境下，增加酶的用量并将温育时间延长至20h，可以减少干扰因子对酶的抑制作用。此外酶的用量达到一定程度时，水解率不再增加，达到稳态。

本研究通过前处理条件的优化得出：以1次沸水浴15min进行1次水解、加0.5mL大鼠血清、样液pH6.8、温育时间20h为最佳前处理条件。利用该法测定柑橘各部位的5-甲基四氢叶酸含量，回收率均在89%以上，准确度好，能够满足实验要求。

参考文献：

[1] 杨玉柱, 王储炎, 焦必宁, 等. 叶酸的研究进展[J]. 农产品加工: 学刊, 2006(5): 31-35.

[2] 谢娇, 王华, 任廷远, 等. 橙汁中叶酸的研究[J]. 食品与发酵科技, 2009, 45(5): 54-57.

[3] 张迅捷. 维生素全书[M]. 北京: 中国民航出版社, 2005: 135-139.

[4] 苗淑彦, 麦康森. 叶酸的营养研究及应用[J]. 饮料工业, 2007, 28(18): 39-42.

[5] 刘晓宁, 姜凌, 王崇英, 等. 作物叶酸代谢工程[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(5): 24-29.

[6] 常娜宁, 姜凌, 蒲训, 等. 作物叶酸检测方法的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(2): 44-49.

[7] GREGORY J F, SARTAIN D B, DAY B P. Fluorometric determination of folacin in biological materials using high performance liquid chromatography[J]. Journal of Nutrition, 1984, 114(2): 341-353.

[8] 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: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2010, 878(29): 2949-2958.

[9] STOKSTAD E L R, SHIN Y S, TAMURA T. Folic acid: biochemistry and physiology in relation to the human nutrition requirement[M]. Washington DC: National Academy of Sciences, 1975: 61.

[10] WHITE D R. Determination of 5-methyltetrahydrofolate in citrus juice by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1990, 38(7): 1515-1518.

[11] STREIFF R R. Folate levels in citrus and other juices[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1971, 24(12): 1390-1392.

[12] PHILLIPS K M, WUNDERLICH K M, HOLDEN J M, et al. Stability of 5-methyltetrahydrofolate in frozen fresh fruits and vegetables[J]. Food Chemistry, 2005, 92(4): 587-595.

[13] DEVI R, ARCOT J, SOTHEESWARAN S, et al. Folate contents of some selected fijian foods using tri-enzyme extraction method[J]. Food Chemistry, 2008, 106(3): 1100-1104.

[14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.211—2008 食品中叶酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

[15] JASTREBOVA J, WITTHÖFT C, GRAHN A, et al. HPLC determination of folates in raw and processed beetroots[J]. Analytical Nutritional and Clinical Methods, 2003, 80(4): 579-588.

[16] JOHANSSON M, FURUHAGEN C, FRØLICH W. Folate content in frozen vegetarian ready meals and folate retention after different reheating methods[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(3): 528-536.

[17] VAHTERSTO L, LEHIKOINEN 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.

[18] MARTIN H, COMESKEY D, SIMPSON R M, et al. Quantification of folate in fruits and vegetables: a fluorescence-based homogeneous assay[J]. Analytical Biochemistry, 2010, 402(2): 137-145.

[19] TAMURA T, MIZUNO Y, JOHNSTON K E, et al. Food folate assay with protease, α-amylase and folate conjugase treatments[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(1): 135-139.

[20] IWATANI Y, ARCOT J, SHRESTHA A K, et al. Determination of folate contents in some Australian vegetables[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2003, 16(1): 37-48.

[21] HEFNI M, ÖHRVIK V, TABEKHA M, et al. Folate content in foods commonly consumed in Egypt[J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 540-545.

[22] ARCOT J, SHRESTHA A. Folate: methods of analysis[J]. Trends in Food Science & Technology, 2005, 16(6/7): 253-266.

[23] LIU Jia, PICKFORD R, MEAGHER A P, et al. Quantitative analysis of tissue folate using ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Analytical Biochemistry, 2011, 411(2): 210-217.

[24] PAWLOSKY R J, FLANAGAN V P, DOHERTY R F. A mass spectrometric validated high-performance liquid chromatography procedure for the determination of folates in foods[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2003, 51(13): 3726-3730.

[25] FREISLEBEN A, SCHIEBERLE P, RYCHLIK M. Specific and sensitive quantification of folate vitamers in foods by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003, 376(2): 149-156.