

Elżbieta Gujska, Marta Czarnowska, Joanna Michalak

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

e-mail: elka@uwm.edu.pl

OCENA METOD OZNACZANIA ZAWARTOŚCI KWASU FOLIOWEGO I FOLIANÓW W SOKACH OWOCOWYCH*

Streszczenie: Celem pracy było oznaczenie kwasu foliowego i folianów w fortyfikowanych sokach owocowych oraz zbadanie możliwości skrócenia metody ich oznaczania. W badanych sokach stwierdzono o około 30% niższe zawartości kwasu foliowego niż deklarowane przez producentów. W doświadczeniu modelowym nie stwierdzono istotnego wpływu dodatku enzymów i ekstrakcji w temperaturze 100°C na wynik oznaczenia dodanego kwasu foliowego. Wynika z tego, że metodę oznaczenia kwasu foliowego można skrócić i pominąć etapy: ekstrakcji oraz hydrolizy. Etapy te miały natomiast istotny wpływ ($\alpha = 0,05$) na wynik oznaczenia naturalnej formy folianów, tj. 5-metylotetrahydrofolianu.

Słowa kluczowe: kwas foliowy, foliany, soki, fortyfikacja.

1. Wstęp

Z badań epidemiologicznych wynika, że istnieje zależność pomiędzy niedostateczną liczbą grup metylowych w organizmie a podatnością komórek na transformacje nowotworowe [Kim 1999; Rampersaud i in. 2002; Schmutte i in. 1998]. Wskazuje się na zwiększenie ryzyka wystąpienia nowotworów szyjki macicy, jelita grubego, płuc, przełyku, trzustki. U ludzi podwyższony poziom homocysteiny we krwi prowadzi do zmian miażdżycowych [Boushey i in. 1995; Das 2003; Wald i in. 2002]. Folia-ny są niezbędnym źródłem grup metylowych w procesie remetylacji homocysteiny do metioniny. Coraz więcej danych wskazuje także na rolę folianów w zachowaniu funkcji poznawczych, demencji i chorobie Alzheimera [Lebiedzińska i in. 2004; Selhub i in. 2000; Snowden i in. 2000]. Prowadzone w ostatnich latach badania dostarczyły wielu dowodów, że związki te odpowiedzialne są za choroby związane z wadami cewy nerwowej (WCN), zwłaszcza rozszczepem kręgosłupa i bezmózgowie [Boddie i in. 2000; Stevenson i in. 2000]. Jednym z działań, jakie podjęto w celu

* Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego nr N N312 213536.

profilaktyki WCN, jest fortyfikacja produktów żywnościowych kwasem foliowym [Green-Raleigh i in. 2006; Ołędzka i in. 2001]. W krajach europejskich żywność wzbogacana kwasem foliowym jest dostępna, jednak niektóre kraje sprzeciwiają się obowiązkowi jej fortyfikacji.

Ważnym zagadnieniem w przypadku omawianych witamin jest ponadto ich oznaczanie. Proces analityczny nastęrcza wielu trudności ze względu na mnogość i zróżnicowanie naturalnych form, małe stężenie w materiałach biologicznych oraz bardzo niską ich stabilność [Arcot i Shrestha 2005; Devi i in. 2008; Vahteristo i in. 1996]. Należy podkreślić, że dostępne dane dotyczące zawartości folianów w żywności nie są wiarygodne, gdyż są wynikiem stosowania różnych, niedostosowanych do materiału metod ekstrakcji i ilościowego oznaczania tych związków. W konsekwencji może to prowadzić do błędnego oszacowania spożycia folianów z dietą [Arcot i in. 2002; Arcot i Shrestha 2005; Gregory III i in. 1990; Puwastien i in. 2010].

Zwiększające się nieustannie wymagania rynku, a przede wszystkim coraz bardziej świadomych konsumentów, zmuszają do poszukiwania nowych rozwiązań. W dobie mody na „zdrową” żywność rodzi się potrzeba opracowania nowych i udoskonalania aktualnie stosowanych metod oznaczania składników biologicznie aktywnych w naturalnych produktach żywnościowych i wzbogacanych. Na rynku pojawia się coraz więcej produktów fortyfikowanych kwasem foliowym. Dość liczną i znaczącą grupę stanowią soki, nektary i napoje owocowe. W kilkudziesięciu sokach przebadanych w Katedrze Towaroznawstwa i Badań Żywności UWM w Olsztynie stwierdzono różną zawartość kwasu foliowego, nie zawsze zgodną z ilością deklarowaną przez producentów. W wielu przypadkach ilość dodanego kwasu foliowego była kilkakrotnie wyższa od ilości deklarowanej, a także – pomimo deklaracji – w kilku sokach nie stwierdzono jego dodatku. Tylko nieliczni producenci wywiązali się ze zobowiązań podanych na etykietach, wzbogacając soki deklarowaną ilością kwasu foliowego. W sytuacji, kiedy nie jest do końca wyjaśnione, jakie skutki dla organizmu może mieć jego nadmierne spożycie, szczególną kontrolą należy objąć rynek produktów wzbogacanych tą witaminą, a także promować produkty naturalnie bogate w foliany. Istnieje zatem potrzeba opracowania metody oznaczania kwasu foliowego i folianów, która nie będzie czasochłonna, a przede wszystkim znajdzie zastosowanie w praktyce przemysłowej [Arcot i Shrestha 2005]. Potrzebę taką widzą nie tylko producenci żywności, w interesie których leży podawanie zawartości cennych składników na etykietach swoich produktów, ale też konsumenci, zainteresowani racjonalnym planowaniem swojej codziennej diety. Obecnie jedną z najpowszechniej stosowanych metod oznaczania zawartości kwasu foliowego i jego pochodnych są metody chromatograficzne.

Celem pracy było zbadanie możliwości skrócenia czasu przygotowania próbek do oznaczenia kwasu foliowego i folianów w sokach owocowych techniką wysokosprawną chromatografią cieczową HPLC. W przypadku badania endogennych folianów w żywności zachodzi konieczność dodawania specyficznych enzymów, które mają za zadanie uwolnienie ich z połączeń z białkami lub polisacharydami, a także

są niezbędne do dekonjugacji form poliglutaminowych folianów. Natomiast w żywności fortyfikowanej, gdzie zawartość endogennych folianów jest niska, a kwasu foliowego wysoka, starano się odpowiedzieć na pytanie, czy stosowanie enzymów może zostać pominięte.

2. Metodyka

Materiał do badań stanowiły zakupione w supermarkecie dwa rodzaje soków owocowych: klarowany i przecierowy. Zawartość kwasu foliowego i folianów oznaczano bezpośrednio po otwarciu opakowań soków i przed upływem terminów przydatności soków do spożycia przy użyciu 4 różnych metod. Metoda I, obejmująca: przygotowanie próbki, ekstrakcję, oczyszczanie oraz rozdział chromatograficzny techniką HPLC, została opracowana na podstawie danych literaturowych [Vahteristo i in. 1996; Arcot i in. 2002; Arcot i Shrestha 2005; Jastrebova i in. 2003].

2.1. Przygotowanie enzymów

α -amylazę (E.C. 3.2.1.1, A-6211) zakupiono w firmie Sigma-Aldrich i rozpuszczono (20 mg/1 ml) w 0,1 M buforze fosforanowym używanym do ekstrakcji (pH = 7,0).

Enzym **hydrolazę- γ -glutamyłową** pozyskiwano z plazmy krwi szczura. 50 ml świeżej plazmy krwi szczura (Europa Bioproducts Ltd, Cambridge) dializowano 12 godz. w temp. 4°C w celu usunięcia endogennych folianów, stosując 0,05 M bufor fosforanowy o pH = 6,1 z dodatkiem 0,1% 2-merkaptioetanolu [Jastrebova i in. 2003]. W czasie dializy bufor zmieniano trzykrotnie. Plazmę krwi szczura przechowywano w małych porcjach (1 ml) w temp. -70 °C przez okres nie dłuższy niż 3 miesiące. Aktywność enzymu sprawdzano przy użyciu kwasu pteroilotri-L-glutaminowego.

2.2. Ekstrakcja

Wszystkie próbki przygotowywane były w przyciemnionym pomieszczeniu. Do próbek wirowniczych Oak Ridge PPCO (Nalgene Co.) o pojem. 50 ml odmierzano 10 ml soku. Dodawano 20 ml 0,1M buforu fosforanowego (pH = 7,00) z dodatkami: 2% (w/v) kwas askorbinowy i 0,1% (v/v) 2-merkaptioetanolu. Próbki ogrzewano w temp. 100°C przez 15 min w łaźni wodnej, wstrząsając trzykrotnie, po czym ochładzano w łaźni lodowej do temperatury pokojowej. Następnie dodawano 0,25 ml hydrolazy γ -glutamyłowej pipetą automatyczną i 1 ml roztworu α -amylazy. Próbki inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godz., po czym, w celu inaktywacji enzymów, ogrzewano przez 5 min we wrzącej łaźni wodnej i chłodzono w łaźni lodowej. Próbki wirowano przez 20 min (12 000 rpm) w temp. 4°C. Płyn z osadu po odwirowaniu zlewano do kolbek miarowych o pojem. 50 ml. Do pozostałego w próbkach osadu dodawano 10 ml 0,1 M buforu fosforanowego pH = 7,0 i ponownie wirowano (12 000 rpm/20 min/4 °C). Uzyskany supernatant zlewano do

tych samych kolbek miarowych. Objętość kolbek uzupełniano do znaku miarowego 0,1 M buforem fosforanowym pH = 7,0 i całość sączono przez sączki karbowane do buteleczek o pojemności 25 ml. W czasie przygotowywania próbki były chronione przed utlenianiem się folianów poprzez przedmuchiwanie azotem.

2.3. Oczyszczanie próbek

Próbki oczyszczano na kolumnach Bakerbond spe J. T. [Baker 7091 – 03 (czwartorzędowa amina)], bezpośrednio przed analizą HPLC. Kolumny kondycjonowano 5 ml metanolu i 5 ml wody. Następnie przez kolumnę przepuszczono 4 ml ekstraktu z próbki (przepływ 1 kropla/min). W celu usunięcia z matrycy składników zanieczyszczających kolumny przepłukiwano 5 ml wody. Foliiany wymywano 0,1 M octanem sodu zawierającym 10% (w/v) chlorku sodu cz.d.a., 1% (w/v) kwasu askorbinowego i 0,1% (v/v) 2-merkaptetanolu. Pierwszą porcję eluatu (0,7 ml) wylano, drugą porcję (4 ml) – odmierzone i zebrano do analizy HPLC [Jastrebova i in. 2003].

2.4. Analiza HPLC

Analizę chromatograficzną przeprowadzono metodą opisaną przez Jastrebovą i in. [2003]. Foliiany rozdzielono na kolumnie chromatograficznej Phenomenex Synergi 4 u Hydro-RP 80A, C18 (250 × 4,6 mm 4 micron). Zastosowano chromatografię gradientową z odwróconymi fazami z przepływem 1 ml/min. Fazę ruchomą stanowił acetonitryl i 30 mM bufor fosforowy o pH = 2,3. Objętość próbki wynosiła 50 µl, temperaturę kolumny ustawiono na 25°C, a temperaturę w autosamplerze na 8 °C. Gradient rozpoczynał się od 5-procentowego udziału (v/v) acetonitrylu i był tak utrzymywany przez pierwsze 8 min przed zwiększeniem do 17,5% (v/v) acetonitrylu w czasie 17 min. Całkowity czas rozdziału wynosił 41 min. Długość fali wzbudzenia w detektorze fluorescencyjnym wynosiła 290 nm, długość fali emisji 360 nm, długość fali w detektorze spektrofotometrycznym (UV-VIS) z matrycą fotodiod ustawiono na 290 nm. Piki identyfikowano na podstawie czasów retencji wzorca i próbki. Obliczenia zawartości kwasu foliowego i folianów dokonano na podstawie wzorca. Powtarzalność metody wykazano wielokrotnie, powtarzając oznaczenia zawartości kwasu foliowego i 5-metyltetrahydrofolianu (5CH₃FH₄) na tej samej próbce, obliczając wartość średniej, odchylenia standardowego oraz współczynnika zmienności.

W porównaniu z opisaną powyżej metodą I oznaczania zawartości kwasu foliowego i folianów w badanych sokach w kolejnych metodach pominięte zostały następujące etapy:

- w metodzie II: dodatek roztworów α -amylazy i hydrolazy γ -glutamylowej, inkubacja oraz dwukrotne wirowanie;
- w metodzie III: trzykrotne wytrząsanie podczas ogrzewania w temp. 100°C/15 min, dodatek roztworów α -amylazy i hydrolazy γ -glutamylowej, inkubacja oraz dwukrotne wirowanie;

- w metodzie IV: ogrzewanie w temp. 100°C/15 min z trzykrotnym wytrząsaniem, dodatek roztworów α -amylazy i hydrolazy γ -glutamylowej, inkubacja oraz dwukrotne wirowanie.

3. Wyniki i dyskusja

W tabeli 1 przedstawiono skrócony opis czynności analitycznych zastosowanych w metodach I, II, III i IV oznaczania kwasu foliowego i folianów w sokach klarowanych i typu przecierowego.

Tabela 1. Diagram przygotowania próbek do oznaczenia kwasu foliowego i folianów 4 metodami

| Etapy przygotowania próbek | | Metoda | | | |
|---|--|--------|----|-----|----|
| | | I | II | III | IV |
| Ekstrakcja | Dodatek 0,1 M buforu fosforanowego pH = 7.0 | + | + | + | + |
| | Wytrząsanie | + | + | + | + |
| | Ogrzewanie 15 min/100°C + 3-krotne wytrząsanie | + | + | | |
| | Ogrzewanie 15 min/100°C bez wytrząsania | | | + | |
| Dodatek α -amylazy (0,02 g na próbkę) | | + | | | |
| Dekoniugacja (dodatek roztworu hydrolazy γ -glutamylowej z osocza krwi szczura w ilości 0,25 ml na próbkę) | | + | | | |
| Inkubacja (37°C/4 godz.) | | + | | | |
| Dwukrotne wirowanie (27 000 g × 20 min 4°C) | | + | | | |
| Oczyszczanie (SPE – ekstrakcja do fazy stałej) | | + | + | + | + |
| Analiza HPLC (detektor fluorescencyjny i spektrofotometryczny) | | + | + | + | + |

Źródło: opracowanie własne.

Tabela 2 przedstawia wyniki oznaczeń kwasu foliowego i folianów w badanych sokach uzyskanych przy zastosowaniu różnych metod ich pozyskania z materiału biologicznego. Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości kwasu foliowego zarówno w soku A (klarowany), jak i soku B (przecierowy), przy zastosowaniu wybranych 4 metod jego oznaczania. Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że kwas foliowy jako forma monoglutaminowa nie wymaga przed oznaczeniem dekonjugacji, w przeciwieństwie do wieloglutaminowych form folianów. Ponadto jako związek syntetyczny dodany do produktu nie jest tak jak naturalne foliany związany z matrycą produktu, wobec czego nie wymaga ogrzewania i wytrząsania podczas ekstrakcji. W metodzie IV pominięto nie tylko proces ekstrakcji w temp. 100°C, ale także etap dodawania enzymów i inkubacji, co znacznie skróciło czas wykonania analizy.

W badanych sokach stwierdzono zawartość jednej formy folianów 5-metylotetrahydrofolianu. Najwyższe zawartości $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ w soku A (klarowany) oznaczono,

Tabela 2. Zawartość kwasu foliowego i 5-metylotetrahydrofolianu ($5\text{CH}_3\text{FH}_4$) w sokach ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$) oznaczona przy zastosowaniu różnych metod

| Metoda* | Kwas foliowy ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)** | | (5CH ₃ FH ₄) ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)** | |
|---------|---|------------------------|--|-----------------------|
| | sok A klarowany | sok B przecierowy | sok A klarowany | sok B przecierowy |
| I | 19,7±1,18 ^{***} | 21,5±0,99 ^a | 3,7±0,37 ^a | 2,7±0,17 ^a |
| II | 18,9±0,78 ^a | 19,8±1,57 ^a | 3,6±0,07 ^a | 2,2±0,19 ^b |
| III | 18,5±0,73 ^a | 20,6±1,40 ^a | 3,3±0,35 ^b | 2,2±0,09 ^b |
| IV | 19,3±0,90 ^a | 21,0±1,57 ^a | 3,3±0,14 ^b | 2,3±0,05 ^b |

*metody opisane w tab. 1; ** średnia zawartość z trzech powtórzeń; *** wartości średnie oznaczone tą samą literą w kolumnach nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$.

Źródło: opracowanie własne na podstawie wyników badań.

stosując metodę I i II. W przypadku zastosowania metody II brak przeprowadzenia hydrolizy za pomocą enzymów nie miał istotnego wpływu na otrzymane zawartości. Wynikać to może z natury badanego soku, tzn. z formy folianów, jakie występują w badanym materiale biologicznym. Analizowany sok stanowił mieszaninę soków z różnych owoców z przewagą owoców cytrusowych. W owocach tych w przeważającej liczbie występują formy jedno-, dwu- lub najwyżej trójglutaminowe folianów, które nie wymagają dekoniugacji przed oznaczeniem techniką HPLC. Ważne natomiast w tym przypadku było wytrząsanie próbek w czasie ekstrakcji w temperaturze 100°C. Pominięcie tego etapu spowodowało obniżenie zawartości formy 5-metylotetrahydrofolianu oznaczonej metodą III i IV. W przypadku soku B (typu przecierowego) zachodziła konieczność stosowania wszystkich etapów oznaczania folianów. Najwyższą (statystycznie istotną, $\alpha = 0,05$) zawartość $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ oznaczono, stosując metodę I. Wynika z tego, że na wynik oznaczenia folianów istotny wpływ ma materiał biologiczny, który jest ich źródłem. Sok B typu przecierowego prawdopodobnie zawierał wieloglutaminowe formy folianów, które także mogły być związane z polisacharydami. Konieczne więc było przeprowadzenie hydrolizy za pomocą hydrolazy- γ -glutamylowej oraz α -amylazy w celu ich całkowitego uwolnienia i oznaczenia.

4. Wnioski

Z przeprowadzonych badań modelowych wynika, że możliwe jest skrócenie czasu oznaczania zawartości kwasu foliowego w sokach klarowanych i typu przecierowego. Można pominąć w metodzie etapy: ekstrakcji w temperaturze 100°C, dodatku enzymów i długiego czasu inkubacji, ponieważ kwas foliowy jako forma monoglutaminowa nie wymaga dekoniugacji, w przeciwieństwie do wieloglutaminowych endogennych form folianów. Oznaczanie naturalnych form tej witaminy w sokach

wymaga przeprowadzenia zarówno ekstrakcji, jak i hydrolizy przy zastosowaniu odpowiednich enzymów oraz właściwie dobranych parametrów czasu i temperatury do rodzaju soku.

Literatura

- Arcot J., Shrestha A., *Folate: methods of analysis*, "Trends in Food Science & Technology" 2005, 16, s. 253-266.
- Arcot J., Shrestha A.K., Gusanov U., *Enzyme protein assay for determining folic acid fortified cereal and stability of folic acid under different extraction conditions*, "Food Control" 2002, 13, s. 245-252.
- Boddie A.M., Dedlow E.R., Nackashi J.A., Opalko F.J., Kauwell G.P.A., Gregory J.F., Bailey L.B., *Folate absorption in woman with a history of neural tube defect-affected pregnancy*, "The American Journal of Clinical Nutrition" 2000, 72, s. 154-158.
- Boushey C.J., Beresford S.A., Omenn G.S., Motulsky A.G., *A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease-probable benefits of increasing folic acid intake*, "Journal of the American Medical Association" 1995, 274, s. 1049-1057.
- Das U.N., *Folic acid says no to vascular diseases*, "Nutrition", 2003, 19, s. 686-692.
- Devi R., Arcot J., Sotheeswaran S., Ali S., *Folate contents of some selected Fijian foods using tri-enzyme extraction method*, "Food Chemistry" 2008, nr 106, s. 1100-1104.
- Green-Raleigh K., Carter H., Mulinare J., Prue Ch., Petrini J., *Trends in Folic acid awareness and behaviour in the United States: The Gallup organization for the march of dimes foundation surveys, 1995-2005*, "Maternal and Child Health Journal" 2006, nr 10, s. 177-182.
- Gregory III J.F., Engelhardt R., Bhandari S.D., Sartain D.B., Gustafson S.K., *Adequacy of extraction techniques for determination of folate in foods and other biological materials*, "Journal of Food Composition and Analysis" 1990, 3, s. 134-144.
- Jastrebova J., Witthöft C., Granath A., Svensson U., Jägerstad M., *HPLC determination of folates in raw and processed beetroots*, "Food Chemistry" 2003, 80, s. 579-588.
- Kim Y.I., *Folate and carcinogenesis: evidence, mechanism, and implications*, "The Journal of Nutritional Biochemistry" 1999, 10, s. 66-88.
- Konings E.J.M., *A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour*, "Journal of AOAC International" 1999, 1(82), s. 119-127.
- Lebiedzińska A., Zdrojewska I., Szefer P., *Rola folianów w żywieniu osób starszych*, "Roczniki PZH 55" 2004, 2, s. 159-164.
- Ołędzka R., Stawarska A., *Rola kwasu foliowego w profilaktyce niektórych schorzeń*, "Bromatologia i Chemia Toksykologiczna" 2001, 4, s. 277-283.
- Puwastien P., Soongsongkiat M., Jittinandana S., Dee-Uam A., Sungpuag P., *Testing of folate conjugase from chicken pancreas vs. commercial enzyme: effect of cooking on folate retention in Thai Foods*, "Journal of Food Composition and Analysis" 2010, s. 1-36.
- Rampersaud G.C., Bailey L.B., Kauwell G.P.A., *Relationship of folate to colorectal and cervical cancer: review and recommendations for practitioners*, "Journal of the American Dietetic Association" 2002, 102, s. 1273-1282.
- Schmutte C., Jonem P.A., *Involvement of DNA methylation on human carcinogenesis*, "The Journal of Biological Chemistry" 1998, 379, s. 377-388.
- Selhub J., Jacques P.F., Wilson P.W.F., Rush D., Rosenberg I.H., *B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in elderly*, "The American Journal of Clinical Nutrition" 2000, 71, s. 614-620.

- Snowdon D.A., Tully C.L., Smith C.D., Riley K.P., Markesbery W.R., *Serum folate and the severity of atrophy of neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun Study*, "The American Journal of Clinical Nutrition" 2000, 71, s. 993-998.
- Stevenson R.E., Allen W.P., Pai G.S., Best R., Seaver L.H., Dean J., Thompson S., *Decline in prevalence of neural tube defects in high-risk region of the USA*, "Pediatrics" 2000, 106, s. 677-683.
- Wald D.S., M. Low, J.K. Morris., *Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis*, "British Medical Journal" 2002, 325, s. 1202-1209.
- Vahteristo L.T., Velimatti O., Koivistoinen P.E., Varo P., *Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography*, "Journal of Agricultural and Food Chemistry" 1996, 44, s. 477-482.

EVALUATION OF METHODS FOR THE DETERMINATION OF FOLIC ACID AND FOLATE IN FRUIT JUICES

Summary: The aim of the study is to examine folic acid and folate content in fortified fruit juices and to shorten the method of these compounds determination. In the tested juices, folic acid was found at the level of about 30% less than declared by the manufacturers on the product package. In the pilot study, no significant effect of enzymes addition and extraction at 100 °C on the result of additive folic acid determination was observed. Thus, it can be concluded that in folic acid determination method the extraction and hydrolysis steps can be omitted. However, the mentioned steps had a significant effect on the result of natural folate form, 5-methyltetrahydrofolate, determination.

Keywords: folic acid, folate, juices, fortification.