

ELŻBIETA GUJSKA, MARTA CZARNOWSKA

## WPLYW WARUNKÓW EKSTRAKCJI I HYDROLIZY NA WYNIK OZNACZANIA ZAWARTOŚCI KWASU FOLIOWEGO I FOLIANÓW W SOKU JABŁKOWYM

### Streszczenie

Soki owocowe fortyfikowane witaminami mogą stać się wygodnym źródłem składników biologicznie aktywnych, w tym kwasu foliowego i naturalnie obecnych w owocach jego pochodnych, folianów. Związki te wykazują jednak niską stabilność chemiczną, co znacznie utrudnia ich oznaczanie. Na podstawie danych literaturowych i badań własnych można stwierdzić, że każdy materiał biologiczny wymaga zastosowania odmiennych warunków przeprowadzenia efektywnej ekstrakcji i hydrolizy badanych składników przed oznaczeniem ich metodą HPLC. Celem badań była ocena wpływu warunków ekstrakcji (pH buforu, czas/temperatura) i hydrolizy (ilość plazmy krwi szczura RP jako źródła koniugazy folianowej) na oznaczenie zawartości kwasu foliowego i folianów w badanym materiale. Największą zawartość kwasu foliowego (32,62 - 34,53  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$  soku) uzyskano, prowadząc ekstrakcję w buforze fosforanowym o  $\text{pH} = 7,0$  w temp.  $100\text{ }^\circ\text{C}$  przez 15 min. Największą natomiast zawartość formy metylowej (4,23 - 4,29  $\mu\text{g}$   $5\text{CH}_3\text{FH}_4/100\text{ ml}$  soku) oznaczono, prowadząc ekstrakcję w buforze fosforanowym o  $\text{pH}=6,1$ , w temp.  $100\text{ }^\circ\text{C}/15\text{ min}$ . Różny dodatek plazmy krwi szczura – przy tych samych warunkach ekstrakcji – nie wpłynął istotnie ( $\alpha = 0,05$ ) na wynik oznaczenia zarówno kwasu foliowego, jak i formy  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ .

**Słowa kluczowe:** sok jabłkowy, kwas foliowy, foliany, hydroliza, ekstrakcja, HPLC

### Wprowadzenie

Kwas foliowy (kwas pteroinoglutaminowy) należy do rodziny rozpuszczalnych w wodzie witamin z grupy B [3, 9, 13, 31]. Naturalnie w żywności występują jego zredukowane pochodne, formy wieloglutaminowe, foliany. Nazwa foliany dotyczy szeregu związków, w których kwas pteroinowy jest związany z jedną lub większą liczbą, nawet do siedmiu, reszt kwasu glutaminowego [24]. Poszczególne związki różnią się między sobą: stopniem utlenienia pierścienia pterydynowego, rodzajem grup jednowęglowych (metylowa, formylowa, forminowa, metylenowa, metynowa) występujących w pozycjach N-5 i N-10 oraz liczbą reszt kwasu glutaminowego [26, 31]. Foliany,

---

*Dr hab. inż. Elżbieta Gujska, mgr inż. Marta Czarnowska, Katedra Towaroznawstwa i Badań Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Pl. Cieszyński 1, 10-957 Olsztyn*

w przeciwieństwie do kwasu foliowego, wykazują niską stabilność chemiczną. Kwas foliowy jest formą najbardziej odporną na chemiczną degradację i z tego względu, jako związek syntetyczny, stosowany jest w suplementach diety i preparatach farmaceutycznych [1, 2, 8, 32].

Foliany występujące naturalnie w żywności, w przewodzie pokarmowym ulegają dekonjugacji do monoglutaminianów przy udziale aktywowanej przez cynk hydrolazy pteroinoglutaminowej. W takiej postaci są wchłaniane do komórek śluzówki jelita, gdzie większość z nich jest redukowana przez reduktazę dihydrofolianową (DHFR) do di- i tetrahydrofolianów. Także w wątrobie foliany są redukowane przez DHFR przede wszystkim do formy 5-metylo-tetrahydrofolianu. Następnie transportowane są do tkanek i ulegają w nich przekształceniu do poliglutaminianów, jak i z żółcią do krążenia wątrobowo-jelitowego [11, 25].

Główna rola, jaką pełni kwas foliowy i jego pochodne w ludzkim organizmie, sprowadza się do przenoszenia jednostek jednowęglowych niezbędnych w wielu reakcjach metabolicznych (biosynteza puryn, przemiany niektórych aminokwasów). Biorą udział w szeregu reakcji syntezy komponentów DNA, RNA i białek. Stanowią źródło grup metylowych (forma 5-metyltetrahydrofolian) niezbędnych w procesie remetylacji homocysteiny do metioniny [5, 31, 32].

Stopień wykorzystania w organizmie folianów z różnego rodzaju produktów waha się w zakresie od 25 do 50 % [9, 11]. Wyniki badań z ostatnich lat wskazują, że biodostępność folianów z owoców, warzyw oraz wątroby może stanowić nawet 80 % biodostępności kwasu foliowego [24]. Kwas foliowy może wchłaniać się nawet w 100 %, gdyż jako monoglutaminian nie wymaga hydrolizy [25].

Spożycie folianów przez osoby dorosłe, według zaleceń żywieniowych, powinno wynosić od 300 do 400 µg/dzień, zależnie od kraju [6, 11, 25]. Instytut Medycyny w USA ustalił średnią zalecaną normę spożycia RDA folianów na 320 µg/dzień [11]. Zalecane dzienne spożycie folianów dla kobiet w ciąży obowiązujące w Polsce to 450 µg/dzień.

Nieprawidłowa dieta jest główną przyczyną wystąpienia niedoboru folianów w organizmie. Na niedobory tej witaminy szczególnie narażone są młode kobiety, które ograniczają spożycie pokarmów bogatych w foliany, aby utrzymać szczupłą sylwetkę [24]. Wyniki wielu badań potwierdzają, że zbyt mała ilość folianów w diecie młodych kobiet wpływa negatywnie nie tylko na ich stan zdrowia, ale także potomstwo [15]. Niedobór tej witaminy w organizmie przyszłych matek zwiększa np. ryzyko wystąpienia wad cewy nerwowej [2, 10, 21]. Inne skutki niedoboru kwasu foliowego i folianów w diecie to homocysteinemia, zmiany miażdżycowe, zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworów szyjki macicy, jelita grubego, płuc, przełyku, trzustki, anemie, zaburzenia funkcjonowania układu nerwowego, zwiększone ryzyko wystąpienia choroby Parkinsona i Alzheimerera u osób starszych [11, 15, 16, 21, 32].

W celu zwiększenia spożycia kwasu foliowego i folianów zaleca się: zwiększenie spożycia produktów naturalnie bogatych w foliany, jak również produktów fortyfikowanych kwasem foliowym, wprowadzenie obowiązku wzbogacania podstawowej żywności kwasem foliowym (mąki, płatki śniadaniowe) czy przyjmowanie suplementów kwasu foliowego [6, 17]. Pierwszym krajem, który w 1998 r. wprowadził obowiązek fortyfikowania produktów zbożowych kwasem foliowym były Stany Zjednoczone [10, 21]. Badania z lat 1995 - 2005 przeprowadzone w krajach, w których obowiązkiem jest wzbogacanie kwasem foliowym wybranych produktów żywnościowych (USA, Chile, Kanada) wskazują, że jest to jedna ze skuteczniejszych metod zapobiegania wystąpienia defektu cewy nerwowej. Fortyfikacja żywności kwasem foliowym wzbudza jednak kontrowersje. Wiadomo, że nadmierna ilość tego związku w organizmie, szczególnie ludzi starszych, może maskować diagnozę deficytu witaminy B<sub>12</sub> [11, 20, 25, 32] i przyspieszać tym samym neurologiczne komplikacje, wchodzić w reakcję z innymi lekami, a także wspomagać rozwój nowotworów [18]. Zarejestrowano także przypadki bardzo silnej alergii na syntetyczny kwas foliowy [26]. W Polsce nie ma obowiązku dodawania do żywności kwasu foliowego, jednak na rynku dostępne są produkty nim wzbogacone.

Różny stopień stabilności folianów w surowcach naturalnych i w produktach utrudnia proces analityczny [5, 30]. Badania przeprowadzone przez niezależne zespoły wykazały, że każdy materiał biologiczny wymaga zastosowania innych parametrów do przeprowadzenia efektywnej ekstrakcji i hydrolizy przed oznaczeniem zawartości folianów metodą mikrobiologiczną lub HPLC [22, 27, 29]. Autorzy sugerują także konieczność poprawienia tabel dotyczących zawartości folianów w żywności, które były oznaczane wcześniej stosowanymi metodami [1, 12, 15]. Bardzo istotny jest sposób pozyskiwania omawianych związków: odpowiednio dobrane warunki ekstrakcji, hydrolizy, oczyszczania ekstraktów przed rozdziałem metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Ogrzewanie próbki prowadzi do denaturacji białek, które wiążą foliany oraz enzymów, które katalizują ich degradację czy też przemiany w inne formy. Co więcej foliany w produktach spożywczych występują w postaci związków poliglutaminowych, które należy poddać dekonjugacji do mono- lub diglutaminianów, stosując hydrolazę  $\gamma$ -glutamylową, potocznie nazywaną koniugazą folianową. Najczęściej stosowanymi źródłami tego enzymu są: plazma ludzka, plazma krwi szczura, nerka świni czy trzustka kurczęcia [1, 2, 8, 14, 28].

Z uwagi na wzrastającą liczbę dostępnych na rynku produktów fortyfikowanych i ich znaczenie dla zdrowia człowieka, pojawia się zapotrzebowanie na wiarygodną, szybką metodę oznaczania zawartości dodanego kwasu foliowego i naturalnie występujących folianów. Zawartość folianów jest powszechnie oznaczana długotrwałą i pracochłonną – niemającą zastosowania w praktyce przemysłowej – metodą mikrobiologiczną. Niewątpliwą zaletą metody HPLC jest to, że pozwala na separację i ilo-

ściowe oznaczenie różnych form folianów [2]. W literaturze brakuje porównywalnych danych dotyczących wpływu temperatury i czasu ekstrakcji, pH buforu oraz źródła pochodzenia hydrolazy  $\gamma$ -glutamylowej na stabilność kwasu foliowego i folianów w ekstrakcie.

Celem podjętych badań było określenie wpływu różnych warunków ekstrakcji i hydrolizy na zawartość folianów w soku owocowym.

### **Material i metody badań**

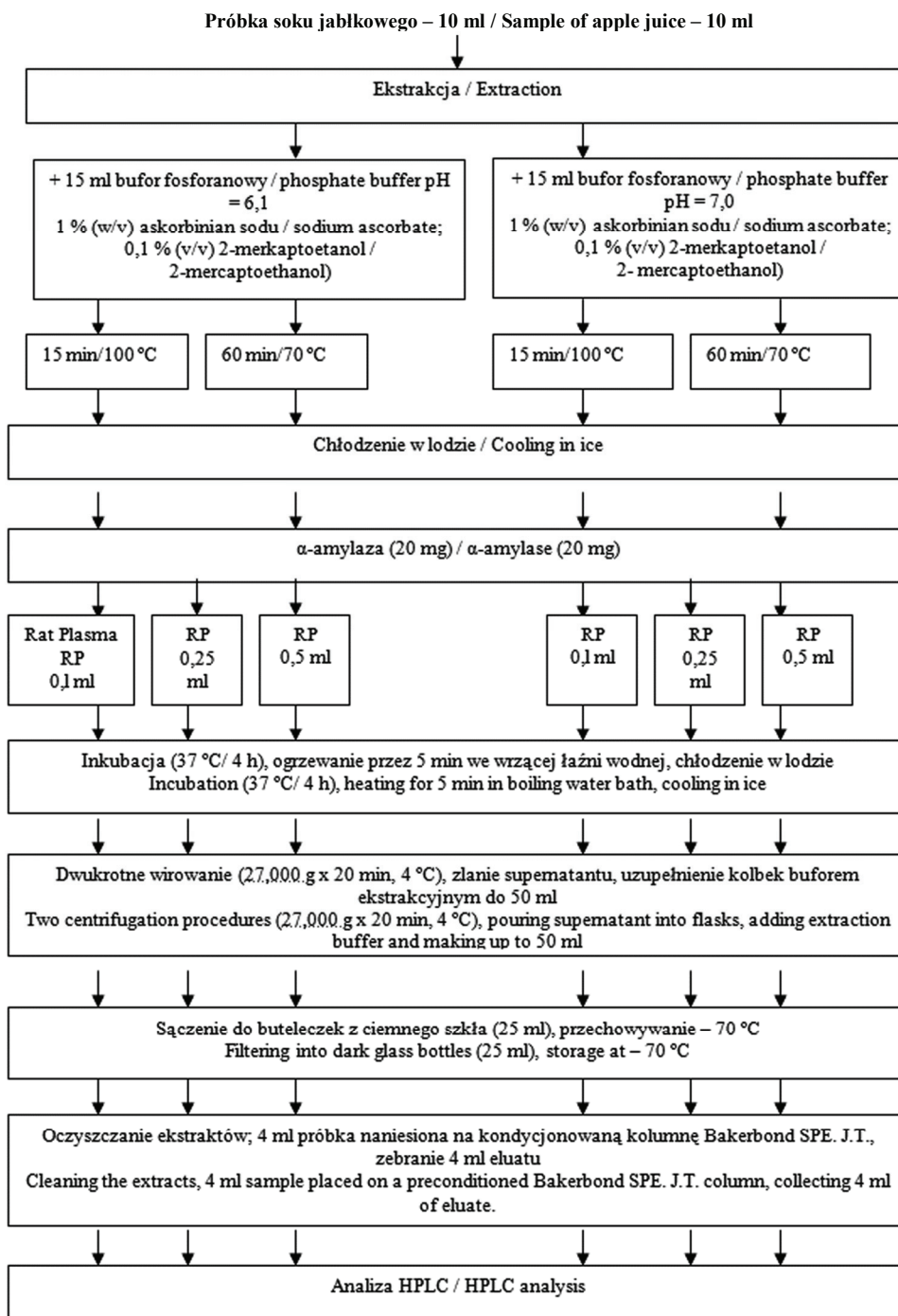
Material badawczy stanowił klarowany sok jabłkowy z deklarowaną na opakowaniu zawartością kwasu foliowego w ilości 30  $\mu\text{g}/100$  ml. Sok zakupiono w hipermarkecie na rynku olsztyńskim. Oznaczenia wykonano na 4 próbach w trzech powtórzeniach.

Wzorcami były: kwas foliowy (PGA), 5-metylotetrahydrofolian ( $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ ), tetrahydrofolian ( $\text{FH}_4$ ) zakupione w firmie Sigma Aldrich i przygotowane według metody opisanej przez Koningsa [19]. Stężenie standardów obliczano przy użyciu współczynników absorpcji molarnej podanych przez Blakleya [4].

Enzym  $\alpha$ -amylazę (E.C. 3.2.1.1, A-6211) zakupiono w firmie Sigma Aldrich. Jako źródło hydrolazy  $\gamma$ -glutamylowej zastosowano plazmę krwi szczura; 50 ml świeżej plazmy krwi szczura (Europa Bioproducts Ltd, Cambridge) dializowano 12 h w temp. 4 °C, w celu usunięcia endogennych folianów, stosując 0,05 M bufor fosforanowy o pH = 6,1 z dodatkiem 0,1 % 0,1 M 2-merkaptetanolu [14]. W czasie dializy bufor zmieniano trzykrotnie. Plazmę krwi szczura przechowywano w małych porcjach (1 ml) w temp. -70 °C nie dłużej niż 3 miesiące.

Przygotowanie próbki do analizy ma decydujący wpływ na zawartość folianów w ekstrakcie i oznaczanie za pomocą HPLC. Na stopień zniszczenia folianów może mieć wpływ: pH buforu użytego do ekstrakcji, rodzaj zastosowanych antyoksydantów dodanych do buforu w celu przeciwdziałania utlenianiu zredukowanych form folianów czy też forma występujących folianów w badanej próbce [13, 27]. Na podstawie danych literaturowych [1, 2, 12, 14, 22, 26, 28] dotyczących oznaczania folianów w różnych surowcach i produktach spożywczych wybrano następujące warunki ekstrakcji i hydrolizy:

- do ekstrakcji stosowano bufor fosforanowy 0,1 M o pH = 6,1 i 7,0,
- czas i temperatura ekstrakcji: 15 min/100 °C; 60 min/ 70 °C,
- źródło hydrolazy  $\gamma$ -glutamylowej: plazma krwi szczura (RP) w ilościach 0,1; 0,25; 0,5 ml.



Rys. 1. Schemat procesu przygotowania próbek.

Fig. 1. Diagram showing the preparation procedure of samples.

Przygotowanie próbek obejmujące ekstrakcję i ilość dodanej plazmy krwi szczura do dekonjugacji przedstawiono na rys. 1. W czasie przygotowywania próbki były chronione przed utlenianiem się folianów poprzez przedmuchiwanie azotem, przygotowywanie przy przyciemnionym świetle oraz chłodzenie w lodzie każdorazowo po ogrzewaniu. Próbki przygotowano w trzech powtórzeniach.

Oczyszczanie próbek przeprowadzono w kolumnach Bakerbond spe J. T. [Baker 7091- 03 (czwartorzędowa amina)], bezpośrednio przed analizą HPLC [14]. Kolumny kondycjonowano 5 ml metanolu i 5 ml wody. Następnie przez kolumnę przepuszczano 4 ml ekstraktu próbki (przepływ 1 kropla/min). W celu usunięcia składników zanieczyszczających, kolumny przepłukiwano 5 ml wody. Foliiany i kwas foliowy wymywano 0,1 M octanem sodu zawierającym 10 % (m/v) chlorku sodu cz.d.a., 1 % (m/v) kwasu askorbinowego i 0,1 % (v/v) 0,1 M 2-merkaptotolanu. Pierwsze porcje eluatu (0,7 ml) wylewano, a następne 4 ml zbierano do kalibrowanych probówek i наносono na szczyt kolumny HPLC.

Rozdział folianów prowadzono w kolumnie chromatograficznej Phenomenex Synergi 4 u Hydro-RP 80A, C18 (250×4,6 mm, 4 μm) według metody opisanej przez Jasterbovą i wsp. [14] przy użyciu chromatografu cieczowego Shimadzu seria LC-10A. 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 50 μl, temp. kolumny 25 °C, temp. w autosamplerze 8 °C. Gradient rozpoczął się od 5 % udziału (v/v) acetonitrylu i był tak utrzymywany przez pierwsze 8 min przed zwiększeniem do 17,5 % (v/v) acetonitrylu w ciągu 17 min. Całkowity czas rozdziału wynosił 41 min. Długość fali wzbudzenia w detektorze fluorescencyjnym wynosiła 290 nm, zaś długość fali emisji 360 nm. Długość fali w detektorze spektrofotometrycznym (UV-VIS) z matrycą fotodiod wynosiła 290 nm. Piki były identyfikowane na podstawie czasu retencji wzorca i próbki. Obliczenia zawartości kwasu foliowego oraz poszczególnych form folianów dokonywano na podstawie wzorca ze znaną zawartością folianów, наносzonego kilkakrotnie na szczyt kolumny chromatograficznej podczas całej serii oznaczeń.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie z trzech powtórzeń. Poddano je analizie statystycznej, stosując trójczynnиковą analizę wariancji. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi oceniano testem Duncana. Analizę statystyczną wykonywano przy użyciu programu Statistica 2008.

## Wyniki i dyskusja

Na podstawie rozdziału chromatograficznego wzorca kwasu foliowego i poszczególnych form folianów w badanych układach modelowych, w próbkach soku zidentyfikowano kwas foliowy oraz jedną formę folianów: 5-metylotetrahydrofolian ( $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ ). Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 1. Przeprowadzone badania po-

zwoliły na określenie wpływu różnych warunków ekstrakcji na zawartość kwasu foliowego i folianów w badanym soku. Największą zawartość kwasu foliowego (32,62 - 34,53  $\mu\text{g}/100$  ml soku) oznaczono przy zastosowaniu ekstrakcji w buforze fosforanowym o  $\text{pH} = 7,0$  przez 15 min w  $100$  °C. Wartości te różniły się istotnie ( $\alpha = 0,05$ ) od wyników uzyskanych przy zastosowaniu innych wariantów warunków ekstrakcji ( $\text{pH} = 7,0$ , 60 min/ $70$  °C;  $\text{pH} = 6,1$ , 15 min/ $100$  °C;  $\text{pH} = 6,1$ , 60 min/ $70$  °C), przy których zawartość kwasu foliowego mieściła się w przedziale od 22,91 do 28,13  $\mu\text{g}/100$  ml soku.

Tabela 1

Zawartość kwasu foliowego i  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  w soku jabłkowym, oznaczona w różnych warunkach ekstrakcji i hydrolizy [ $\mu\text{g}/100$  ml soku].

Content of folic acid and  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  in apple juice as determined under different conditions of extraction and hydrolysis [ $\mu\text{g}/100$  ml juice].

Warunki ekstrakcji i hydrolizy Conditions of extraction and hydrolysis				Kwas foliowy Folic acid [ $\mu\text{g}/100$ ml]	$5\text{CH}_3\text{FH}_4$ 5-methyltetra- hydrofolian [ $\mu\text{g}/100$ ml]
pH buforu buffer pH	Czas Time [min]	Temperatura Temperature [° C]	Ilość dodanej hydrolazy $\gamma$ -glutamylowej [ml] Added amount of $\gamma$ -glutamyl hydrolase [ml]		
6,1	15	100	0,1	24,49 $\pm$ 0,66 ab*	4,28 $\pm$ 0,35 e*
6,1	15	100	0,25	26,31 $\pm$ 0,56 bc	4,29 $\pm$ 0,18 e
6,1	15	100	0,5	28,13 $\pm$ 1,95 c	4,23 $\pm$ 0,14 e
7,0	15	100	0,1	34,53 $\pm$ 0,54 d	2,84 $\pm$ 0,16 b
7,0	15	100	0,25	33,53 $\pm$ 0,53 d	2,81 $\pm$ 0,24 b
7,0	15	100	0,5	32,62 $\pm$ 2,83 d	2,75 $\pm$ 0,08 b
6,1	60	70	0,1	23,74 $\pm$ 0,40 ab	3,91 $\pm$ 0,09 de
6,1	60	70	0,25	23,47 $\pm$ 0,12 ab	3,55 $\pm$ 0,30 cd
6,1	60	70	0,5	22,91 $\pm$ 0,75 a	3,51 $\pm$ 0,01 c
7,0	60	70	0,1	25,34 $\pm$ 1,59 ab	2,03 $\pm$ 0,00 a
7,0	60	70	0,25	24,87 $\pm$ 0,18 ab	1,98 $\pm$ 0,03 a
7,0	60	70	0,5	25,16 $\pm$ 1,30 ab	2,05 $\pm$ 0,06 a

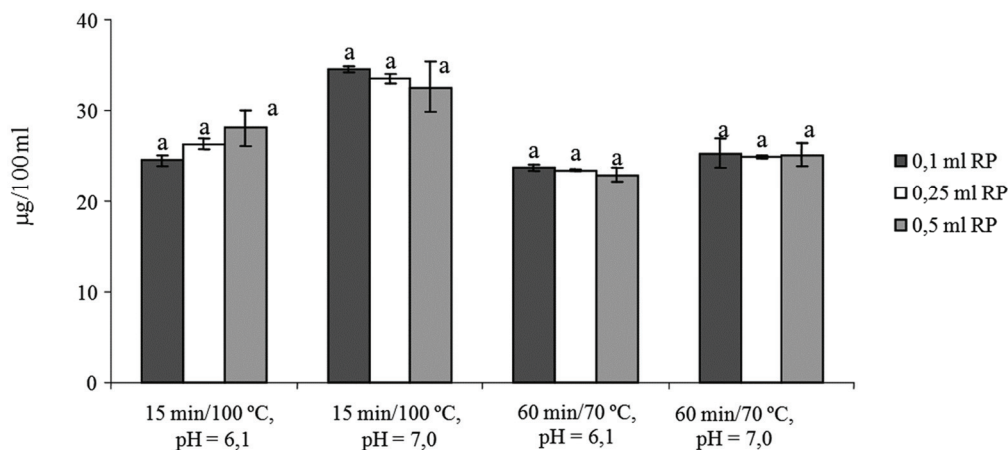
Objaśnienia: / Explanatory notes:

\* – wartość średnia  $\pm$  odchylenie standardowe / mean value  $\pm$  standard deviation.

Wartości średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie istotnie ( $\alpha = 0,05$ ) / Mean values denoted by the same letter do not differ statistically significantly ( $\alpha = 0,05$ ).



Statystycznie istotne ( $\alpha = 0,05$ ) zróżnicowanie zawartości oznaczonej formy  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  uzyskano we wszystkich zastosowanych warunkach ekstrakcji. Największą zawartość  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  (4,23 - 4,29  $\mu\text{g}/100$  ml soku) uzyskano przy prowadzeniu ekstrakcji w buforze fosforanowym o  $\text{pH} = 6,1$  przez 15 min/ $100^\circ\text{C}$ . Najmniejszą natomiast zawartość  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  (1,98 - 2,05  $\mu\text{g}/100$  ml soku) oznaczono, kiedy ekstrakcja prowadzona była w buforze o odczynie obojętnym, tj.  $\text{pH} = 7,0$  przez 60 min w  $70^\circ\text{C}$ . Wyniki te były co najmniej dwukrotnie niższe od najwyższych wartości uzyskanych w doświadczeniu, w którym zastosowano bufor o lekko kwaśnym odczynie, tj. 6,1 i krótkim czasie ogrzewania (15 min) w temp.  $100^\circ\text{C}$ . Istotnie wyższe wyniki oznaczeń naturalnej formy folianów uzyskano, stosując do ekstrakcji bufor fosforanowy o  $\text{pH} = 6,1$ ; zarówno w temperaturze 100, jak i  $70^\circ\text{C}$ . Można sądzić, że czas ogrzewania był także czynnikiem w istotny sposób wpływającym na destrukcję folianów, ponieważ wyższe wyniki oznaczeń uzyskano w próbkach poddanych ogrzewaniu przez 15 min w temp.  $100^\circ\text{C}$ , aniżeli przez 60 min w temp. niższej, tj.  $70^\circ\text{C}$ , zarówno w przypadku próbek ekstrahowanych buforem o  $\text{pH} = 7,0$ , jak i  $\text{pH} = 6,1$ .



\* Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami, w tych samych warunkach ekstrakcji, nie różnią się statystycznie istotnie ( $\alpha = 0,05$ ) / Mean values denoted by the same letter, under the same extraction conditions, do not differ statistically significantly ( $\alpha = 0.05$ ).

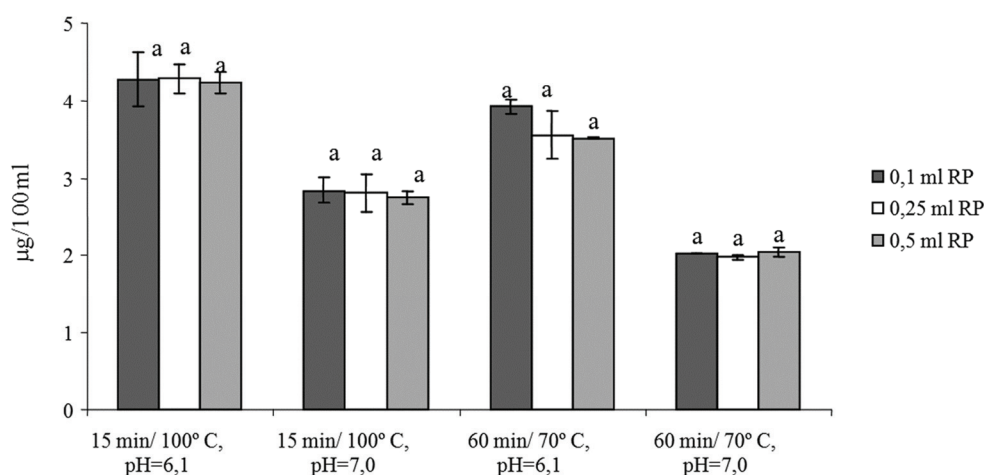
Rys. 2. Wpływ dodatku hydrolazy  $\gamma$ -glutamylowej z plazmy krwi szczura (RP) na zawartość kwasu foliowego w soku jabłkowym.

Fig. 2. Effect of added  $\gamma$ -glutamyl hydrolase from blood plasma of rats (RP) on content of folic acid in apple juice.

Przeprowadzone badania umożliwiły sprawdzenie, czy ilość dodanej koniugazy foliowej, której źródło stanowiła plazma krwi szczura (RP), ma istotny wpływ na ilość oznaczanych folianów i kwasu foliowego. Dotychczas różni badacze stosowali



dodatek tego enzymu w różnych ilościach w zależności od materiału biologicznego [1, 12, 13, 14, 17, 23]. W badaniach – w tych samych warunkach ekstrakcji – każdorazowo stosowano dodatek różnych ilości RP, tj. 0,1; 0,25 i 0,5 ml, do 10 ml próbek soku. Wyniki oznaczania zawartości kwasu foliowego wskazują na brak istotnych różnic ( $\alpha = 0,05$ ) zastosowanych ilości koniugazy folianowej w tych samych warunkach ekstrakcji i hydrolizy (rys. 2).



\* Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami, w tych samych warunkach ekstrakcji, nie różnią się statystycznie istotnie ( $\alpha = 0,05$ ) / Mean values denoted by the same letters, under the same extraction conditions do not differ statistically significantly ( $\alpha = 0.05$ ).

Rys. 3. Wpływ dodatku hydrolazy  $\gamma$ -glutamylowej z plazmy krwi szczura (RP) na zawartość  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  w soku jabłkowym.

Fig. 3. Effect of added  $\gamma$ -glutamyl hydrolase from blood plasma of rats (RP) on content of  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  in apple juice.

Nie stwierdzono także istotnego wpływu ( $\alpha = 0,05$ ) dodatku różnych ilości enzymu na zawartość naturalnej formy folianu –  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  (rys. 3).

Analiza wariancji wykazała, że na zmiany oznaczonej ilości kwasu foliowego i formy  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$  statystycznie istotny wpływ miały: pH buforu zastosowanego do ekstrakcji oraz czas i temperatura ekstrakcji, natomiast ilość dodanego enzymu nie miała istotnego wpływu (tab. 2).

Tabela 2

Wyniki analizy wariancji (F) określające wpływ pH buforu, ilości dodanego enzymu oraz czasu i temperatury ekstrakcji na zawartość kwasu foliowego i 5CH<sub>3</sub>FH<sub>4</sub> w soku jabłkowym.

Results of variance analysis (F-values) identifying the effect of pH of buffer, quantity of enzyme, time & temperature on the content of folic acid and 5CH<sub>3</sub>FH<sub>4</sub>.

Rodzaj zmiennej Type of variable	Zawartość kwasu foliowego Content of folic acid	Zawartość 5CH <sub>3</sub> FH <sub>4</sub> Content of 5-methyltetrahydrofolian
pH buforu pH of Buffer	81***	465***
Ilość enzymu Quantity of enzyme	0,05	1,3
Czas/temperatura Time/temperature	129***	92***

\*\*\*istotne na poziomie  $p < 0,001$  / significant at  $p < 0.001$

### Wnioski

1. Warunki ekstrakcji i hydrolizy odgrywają istotną rolę w oznaczaniu kwasu foliowego i folianów. Przeprowadzone badania wskazują na konieczność zastosowania innych parametrów ekstrakcji i hydrolizy (pH, czas i temperatura ekstrakcji) do oznaczeń dodanego syntetycznego kwasu foliowego i folianów.
2. Zaadaptowanie metody oznaczania kwasu foliowego i folianów w sokach owocowych pozwoli na objęcie pełniejszą kontrolą produktów fortyfikowanych kwasem foliowym, biorąc pod uwagę także zawartość naturalnie obecnych w nich folianów. Jest to konieczne ze względu na brak uregulowań prawnych dotyczących wzbogacania żywności i suplementacji diety kwasem foliowym w Polsce i w Unii Europejskiej oraz w związku z pojawiającymi się kontrowersjami dotyczącymi wpływu nadmiaru kwasu foliowego na organizm człowieka.

### Literatura

- [1] Arcot J., Shrestha A.: Folate: methods of analysis. Trends Food Sci. Technol., 2005, **16**, 253-266.
- [2] Arcot J., Shrestha A., Gusanov U.: Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. Food Control, 2002, **13**, 245-252.
- [3] Blake Ch.J.: Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review. Anal. Bioanal. Chem., 2007, **389**, 63-76.
- [4] Blakely R.L.: The biochemistry of folic acid and related pteridines. Amsterdam 1969.
- [5] Bree A., Dusseldrop M., Brouwer A., Hof K.H., Steegers-Theunissen R.P.M.: Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake. Eur. J. Clin. Nutr., 1997, **51**, 643-660.

- [6] Buttriss J.: Strategies designed to increase awareness about folates and health, and to increase folate intake: A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 2005, **16**, 246-252.
- [7] Cieślak E., Florkiewicz A.: Aspekty żywieniowe soków i napojów nowej generacji, *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2001, **3**, 19-21.
- [8] Dang J., Arcot J., Shrestha A.: Folate retention in selected processed legumes. *Food Chem.*, 2000, **68**, 295-298.
- [9] Forssén K.M., Jägerstad M.I., Wigertz K., Witthöft C.M.: Folates and dairy products: A critical update. *J. Am. College Nutr.*, **2** (19), 100-110.
- [10] 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. *Matern. Child Health J.*, 2006, **10**, 177-182.
- [11] Gregory III J.F., Quinlivan E.P., Davis S.R.: Integrating the issues of folate bioavailability, intake and metabolism in the era of fortification. *Trends Food Sci. Technol.*, 2005, **16**, 229-240.
- [12] Gujska E., Kuncewicz A.: Determination of folate in some cereals and commercial cereal-grain products consumed in Poland using trienzyme extraction and high-performance liquid chromatography methods. *Eur. Food Res. Technol.*, 2005, **221**, 208-213.
- [13] Hefni M., Öhrvik V., Tabekha M., Witthöft C.: Folate content in foods commonly consumed in Egypt. *Food Chem.*, 2010, **121**, 540-545.
- [14] Jastrebova J., Witthöft C., Granath A., Svensson U., Jägerstad M.: HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. *Food Chem.*, 2003, **80**, 579-588.
- [15] Jägerstad M., Jastrebova J., Svensson U.: Folates in fermented vegetables- a pilot study. *Lebensm.-Wiss. u.- Technol.*, 2004, **37**, 603-611.
- [16] Jägerstad M., Piironen V., Walker C., Ros G., Carnovale E., Holasova M., Nau H.: Increasing food folate through bioprocessing and biotechnology. *Trends Food Sci. Technol.*, 2005, **16**, 298-306.
- [17] Johnston K.E., Lofgren P.A., Tamura T.: Folate concentrations of fast foods measured by trienzyme extraction method. *Food Res. Int.*, 2002, **35**, 565-569.
- [18] Kim Y.I.: Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, **80**, 1123-1128.
- [19] Konings E.J.M.: A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. *J. AOAC Int.*, 1999, **1** (82), 119-127.
- [20] Nathoo T., Holmes Ch.P., Ostry A.: An analysis of the development of Canadian food fortification policies: the case of vitamin B. *Health Promotion Int.*, 2005, **4**(20), 375-382.
- [21] Neuhauser M.L., Beresford S.A.A.: Folic Acid: Are Current Fortification Levels Adequate? *Nutrition*, 2001, **10**(17), 868-872.
- [22] Pfeifer C.M., Rogers L.M., Gregory III J.F.: Determination of folate in cereal-grain products using tri-enzyme extraction and combined affinity and reversed-phase liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 407-413.
- [23] Phillips K.M., Wunderlich K.M., Holden J.M., Exler J., Gebhardt S.E., Haytowitz D.B., Beecher G.R., Doherty R.F.: Stability of 5-methyltetrahydrofolate in frozen fresh fruits and vegetables. *Food Chem.*, 2005, **92**, 587-595.
- [24] Pietruszka B.: Efektywność uzupełniania diety folianami na tle czynników ryzyka niedoboru folianów u młodych kobiet. *Wyd. SGGW, Warszawa* 2007.
- [25] Rampersaud G.C., Kauwell G.P.A., Bailey L.B.: Folate: A key to optimizing health and reducing disease risk in the elderly. *J. Am. College Nut.*, 2003, **1** (22), 1-7.
- [26] Smith J., Empson M., Wall C.: Recurrent anaphylaxis to synthetic folic acid. *The Lancet*, 2007, **370**, 9588.
- [27] Storozhenko S., Ravel S., Zhang G., Rébeillé F., Lambert W., van der Straten D.: Folate enhancement in staple crops by metabolic engineering. *Trends Food Sci. Technol.*, 2005, **16**, 271-281.

- [28] Strålsjö L., Arkbåge K., Witthöft C., Jägerstad M.: Evaluation of a radioprotein- binding assay (RPBA) for folate analysis in berries and milk. *Food Chem.*, 2002, **79**, 525-534.
- [29] Tamura T., Mizuno Y., Johnson K.E., Jacob R.A.: Food folate assay with protease,  $\alpha$ -amylase and folate conjugase treatments. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 135-139.
- [30] 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. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 477-482.
- [31] Vora A., Riga A., Dollimore D., Alexander K. S.: Thermal stability of folic acid. *Thermochemica Acta*, 2002, 392-393, 209-220.
- [32] Wright A.J.A., Finglas P.M., Southon S.: Proposed mandatory fortification of the UK diet with folic acid have potential risks been underestimated? *Trends Food Sci. Technol.*, 2001, **12**, 313-321.

#### EFFECT OF EXTRACTION AND HYDROLYSIS CONDOTIONS ON THE DETERMINED CONTENT VALUE OF FOLIC ACID AND FOLATES IN APPLE JUICE

##### S u m m a r y

Vitamin-fortified fruit juices may be a convenient source of biologically active compounds including the folic acid and folates, its derivatives, which naturally occur in fruits. However, those compounds show a low chemical stability, which makes the determination of their content very difficult. Based on the reference literature and the authors' own study, it has been found that any biological material needs different conditions to be applied to the effective extraction and hydrolysis of its components prior to their determination using a HPLC method. The objective of the research was to determine the effect of different conditions of extraction (pH of buffer, time/temperature) and hydrolysis (RP - quantity of plasma in the blood of rats as a source of folate conjugase) on the content of folic acid and folates in the material analyzed. The highest content of folic acid (32.62 - 34.53  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$  juice) was determined when the extraction was performed using a phosphate buffer of pH = 7.0 at 100° C for 15 minutes. The highest content of methyl form (4.23 - 4.29  $\mu\text{g } 5\text{CH}_3\text{FH}_4/100\text{ml}$  juice) was determined in the case of the extraction carried out in a phosphate buffer of pH=6.1 at 100° C for 15 minutes. Different amounts of plasma in the blood of rats added under the same conditions of extraction had not any significant effect ( $\alpha =0.05$ ) on the determined content values of both the folic acid and  $5\text{CH}_3\text{FH}_4$ .

**Key words:** apple juice, folic acid, folates, hydrolysis, extraction, HPLC 