

# 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

戴金凤<sup>1</sup>, 徐明芳<sup>1</sup>, 段翰英<sup>2</sup>, 邱瑞霞<sup>2</sup>, 王超<sup>2,3</sup>

(1. 暨南大学生命科学技术学院, 广东广州 510632) (2. 暨南大学食品科学与工程系, 广东广州 510632)

(3. 暨南大学-萨斯喀切温大学“油料生物炼制与营养”联合实验室, 广东广州 510632)

**摘要:** 本文建立了超高效液相色谱串联三重四级杆质谱(UPLC-MS/MS)定量测定四棱豆中总叶酸的含量和多聚谷氨酸叶酸分布的方法。四棱豆在缓冲液中蒸煮灭活内源多聚谷氨酸水解酶和破坏叶酸结合蛋白, 使结合态叶酸变成游离态, 过滤得提取液。将提取的各种形式叶酸转化为5-甲基四氢蝶酰多聚谷氨酸(5MTHFGlu<sub>n</sub>), 并经C18萃取小柱除盐后, 采用UPLC分离不同形态的5MTHFGlu<sub>n</sub>, 电喷雾正离子电离模式(ESI<sup>+</sup>)和多反应监控扫描模式(MRM)测定不同形态的5MTHFGlu<sub>n</sub>含量。方法采用PteGlu<sub>(1-6)</sub>作为内标, 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub>外标进行定量。该方法灵敏度高, 最低检测限(LOD)为40~1133 fmol, 最低定量限(LOQ)为120~3400 fmol, 精密程度为0.5%~6.8%, 平均回收率为43%。研究发现四棱豆中多聚谷氨酸叶酸的主要形式是蝶酰五谷氨酸, 占叶酸总量的65%; 其次是蝶酰五谷氨酸占30%; 其它形式只占5%; 总叶酸含量为1.1 μmol/100 g, 其含量显著高于菠菜和西兰花等蔬菜。该方法快捷、灵敏、精确, 适用于蔬菜中叶酸的分析和

**关键词:** UPLC-MS/MS; 总叶酸; 多聚谷氨酸叶酸; 四棱豆

文章编号: 1673-9078(2015)10-295-300

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.048

## Determination of Total Folate Content and Polyglutamate Folate Distribution in Winged Beans Using UPLC-MS/MS

DAI Jin-feng<sup>1</sup>, XU Ming-fang<sup>1</sup>, DUAN Han-ying<sup>2</sup>, QIU Rui-xia<sup>2</sup>, WANG Chao<sup>2,3</sup>

(1. Department of Biotechnology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

(2. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China) (3. Guangdong Saskatchewan

Oilseed Joint Laboratory, Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** An ultra-high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC-MS/MS) method was established to determine the total folate content and polyglutamate folate distribution in winged beans. Coarsely chopped winged beans were boiled to inactivate endogenous polyglutamate hydrolase and degrade folate-binding proteins so that the bound folate was converted to free form. After filtration, the extracted folate in various forms was converted to 5-methyl tetrahydrofolate polyglutamyl (5MTHFGlu<sub>n</sub>), salt was removed using a C18 SPE cartridge, and UPLC was performed to separate the different forms of 5MTHFGlu<sub>n</sub>. The content of 5MTHFGlu<sub>n</sub> in different forms were determined using positive electrospray ionization (ESI<sup>+</sup>) under multiple reaction monitoring (MRM) mode. Quantitative analysis was conducted using PteGlu<sub>(1-6)</sub> as the internal standard and 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub> as external standards. The method showed high sensitivity, with a limit of detection of 40~1133 fmol and a limit of quantification of 120~3400 fmol. The precision of determination ranged from 0.5% to 6.8% and the average recovery was 43%. The results showed that the predominant form of polyglutamate folate in winged bean was pentaglutamyl folate (65%), followed by 5MTHF, accounting for 29.6%; other forms accounted for only 5.6%. The total folate content in fresh winged beans was 1.1 μmol/100 g, which was significantly higher than that in spinach and broccoli. This method is fast, sensitive, and accurate, and is suitable for determining total folate and polyglutamyl folate distribution in different vegetables.

**Key words:** ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry; total folate; polyglutamate folate; winged bean

收稿日期: 2015-01-03

基金项目: 国家自然科学基金 (31201404)

作者简介: 戴金凤, 女, 硕士研究生

通讯作者: 王超, 女, 博士, 副教授; 徐明芳, 女, 博士教授

叶酸是人体必需维生素, 需要从食物中摄取<sup>[1]</sup>。虽然蔬菜及水果中天然叶酸含量丰富<sup>[2]</sup>, 但其通常与多个谷氨酸结合<sup>[3]</sup>, 使得天然叶酸在人体中的生物利用率较低, 导致现代人体叶酸缺乏现象依然广泛存在

[4]。据调查,我国南北方落后地区,叶酸缺乏率高达40%<sup>[1]</sup>,因其缺乏所引起的慢性疾病(如心血管疾病)及婴儿神经管缺陷等疾病居世界首位<sup>[2,5]</sup>。近年来,叶酸在预防和治疗神经管缺陷及同型半胱氨酸血症等多种疾病上具有显著疗效<sup>[6-7]</sup>。蔬菜中叶酸的存在形式多样:根据氧化还原程度的不同,包含有四氢叶酸、5-甲基-四氢叶酸、5-甲酰基-四氢叶酸、10-甲酰基-四氢叶酸、5,10-亚甲基-四氢叶酸、5-甲叉亚甲基-四氢叶酸等;根据谷氨酸链的长短,可形成1~17个谷氨酸残基的叶酸(见图1)。叶酸因常与多个谷氨酸结合导致在人体吸收利用情况差异很大,研究表明只有单谷氨酸叶酸才能被肠道吸收而被人体利用<sup>[8]</sup>,因此测定蔬菜中各叶酸的分布情况可为人类叶酸合理膳食提供理论依据。

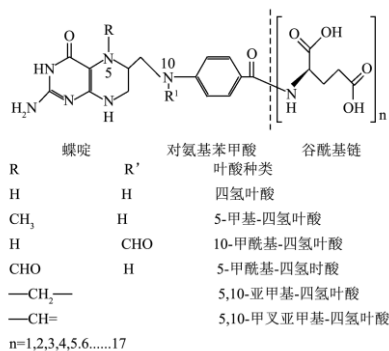


图1 多聚谷氨酸叶酸的化学结构

Fig.1 Chemical structure of polyglutamylated folates

当前对食品中叶酸定量分析方法的研究受到国内外广泛关注。目前叶酸的相关分析主要有微生物法<sup>[9]</sup>、HPLC结合紫外检测法、电化学及荧光检测法<sup>[3,10,11]</sup>。其中微生物法为传统最常用的方法,但它只能检测叶酸的总含量,并不能检测各叶酸分布,且操作费时繁琐,重复性差。随后人们倾向使用HPLC法,但该方法对样品纯度要求高,且灵敏度低。近年王超等<sup>[12]</sup>用UPLC-MS/MS法成功分析了菠菜等8种蔬菜中叶酸的分布情况。UPLC-MS/MS法具有快速,灵敏,高选择性的特点,用来定量分析叶酸高效且灵敏,但容易受到复杂基质的干扰<sup>[13-14]</sup>,而合适的内标可以降低复杂基质产生的干扰。

四棱豆(*Psophocarpus tetragonolobus* D.C),因含有丰富的植物蛋白、膳食纤维及微量元素等而被人们称为“绿色金子”。目前对四棱豆的营养研究仅限于蛋白质和脂质的组成和种类及生物利用性上<sup>[15-17]</sup>,还未见叶酸含量及其多聚谷氨酸叶酸分布的相关研究。

本研究从新鲜四棱豆中提取天然叶酸,利用柱前转化的方法将不同形式的叶酸均转化为5-甲基四氢叶酸,并通过UPLC-MS/MS方法进行测定,从而获取

了总叶酸的含量及各形式叶酸的分布情况,这填补了四棱豆中叶酸含量及其分布形式的空白。本文所建立的定量方法同样适用于其它蔬菜中叶酸的分析和

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与材料

新鲜四棱豆:从广东省翁源县青云山农业合作社试验田采摘,采摘后立刻抽真空包装,置于冰盒,在3个小时内运到实验室进行测定。蝶酰单谷氨酸(PteGlu<sub>1</sub>)(Sigma公司);蝶酰-γ-L-二谷氨酸(PteGlu<sub>2</sub>),蝶酰-γ-L-三谷氨酸(PteGlu<sub>3</sub>),蝶酰-γ-L-四谷氨酸(PteGlu<sub>4</sub>),蝶酰-γ-L-五谷氨酸(PteGlu<sub>5</sub>),蝶酰-γ-L-六谷氨酸(PteGlu<sub>6</sub>),均购于schircks实验室;抗坏血酸(Sigma公司);抗坏血酸钠(Sigma公司);L-5-甲基四氢叶酸钙(上海西宝生物科技有限公司);醋酸氨,磷酸二氢钠,氢氧化钠,甲酸(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);盐酸(分析纯,广州化学试剂二厂);硼氢化钠(分析纯,天津市福晨化学试剂厂);冰乙酸(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);2-辛醇(分析纯,aladdin公司);甲醛(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);HPLC级甲醇,HPLC级乙腈,均购于美国Burdick&Jackson公司;二硫苏糖醇(分析纯,Amresco公司);C18反相固相萃取(SPE)小柱(Sep-pak,Waters公司);实验用水为Millipore超纯水。

### 1.2 仪器和装置

EL104电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);pHS-3C雷磁pH计(上海精密科学仪器有限公司);SB-5200DTS双频超声波清洗器(宁波新艺超声设备有限公司);UV-1750紫外可见分光光度计(日本岛津公司);SHZ-DIII循环水真空泵(巩义市予华仪器有限公司);IKA T18 Basic均质器(德国IKA公司);超纯水制备机(Thermo公司);安捷伦1290高效液相色谱-安捷伦6460三级四重杆质谱联用仪(安捷伦,美国)。

### 1.3 仪器条件

#### 1.3.1 色谱条件

安捷伦1290液相色谱系统;色谱柱:HILIC柱(4.50 mm×100 mm,粒径2.6 μm)(kineie);流动相:10 mmol/L乙酸铵(含0.2%的乙酸)-乙腈(体积比为50:50等度洗脱);进样量:2 μL;流速为0.8 mL/min。

#### 1.3.2 质谱条件

电喷雾正离子(ESI<sup>+</sup>)模式,电喷雾电压:3.50 kV, 度:300 ℃,扫描模式:多离子监测模式(MRM), 定量离子对和质谱设置参数见表1。

表1 三重四级杆质谱设置参数

Table 1 MS/MS parameters for folate quantitation

化合物名称(缩写)	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	碎片电压/V	碰撞能/eV	保压时间/ms
蝶酰单谷氨酸(PteGlu <sub>1</sub> )	442	295	110	16	40
蝶酰二谷氨酸(PteGlu <sub>2</sub> )	571	295	140	24	40
蝶酰三谷氨酸(PteGlu <sub>3</sub> )	700	295	180	36	40
蝶酰四谷氨酸(PteGlu <sub>4</sub> )	829	295	190	40	40
蝶酰五谷氨酸(PteGlu <sub>5</sub> )	958	295	240	47	40
蝶酰六谷氨酸(PteGlu <sub>6</sub> )	1087	295	300	59	40
5-甲基-四氢蝶酰单谷氨酸(5MTHFGlu <sub>1</sub> )	460	313	110	16	40
5-甲基-四氢蝶酰二谷氨酸(5MTHFGlu <sub>2</sub> )	589	313	140	26	40
5-甲基-四氢蝶酰三谷氨酸(5MTHFGlu <sub>3</sub> )	718	313	180	35	40
5-甲基-四氢蝶酰四谷氨酸(5MTHFGlu <sub>4</sub> )	847	313	210	39	40
5-甲基-四氢蝶酰五谷氨酸(5MTHFGlu <sub>5</sub> )	976	313	270	47	40
5-甲基-四氢蝶酰六谷氨酸(5MTHFGlu <sub>6</sub> )	1105	313	290	53	40

#### 1.4 PteGlu<sub>(1-6)</sub> 内标溶液的配制

配制适宜浓度的各叶酸标准储备液 3 mL: PteGlu<sub>1</sub> (108 μmol/L), PteGlu<sub>2</sub> (410 μmol/L), PteGlu<sub>3</sub> (290 μmol/L), PteGlu<sub>4</sub> (306 μmol/L), PteGlu<sub>5</sub> (360 μmol/L), PteGlu<sub>6</sub> (332 μmol/L)。将六种叶酸标准液按 2:1:1:1:1:1 的体积比混合配成 PteGlu<sub>(1-6)</sub> 内标 1 mL。

#### 1.5 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub> 标准溶液的准备

##### 1.5.1 PteGlu<sub>(1-6)</sub> 转化为 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub>

分别取 1 mL 的 PteGlu<sub>(1-6)</sub> 标准储备液(浓度见 1.4)和 1 mL 的 5-甲基四氢叶酸钙标准品(410 μmol/L)于 25 mL 用锡箔纸包好的锥形瓶中,加入 1 mL 100 mmol/L 含 1% 抗坏血酸钠的醋酸铵缓冲溶液(pH=7.4),充分混匀后,往烧杯内加 1 mL 2-辛醇和 4 mL 120 g/L NaBH<sub>4</sub>,振荡混匀,静置 10 min,用 5 mol/L CH<sub>3</sub>COOH 调 pH=7.4,加入 37% 甲醛 160 μL,振荡混匀,放置 5 min,加入 4 mL 120 g/L NaBH<sub>4</sub>,振荡混匀,静置 10 min,转化完成。反应液转移到 25 mL 的容量瓶中,并用 3.2 mol/L NaBH<sub>4</sub> 溶液定容到刻度线。反应液在室温下放置 3 h,待过量的 NaBH<sub>4</sub> 晶体析出后,取 5 mL 上清液过 0.45 μm 滤膜。这里加入 5-甲基四氢叶酸的目的是测定方法的回收率。

##### 1.5.2 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub> 的纯化和标准曲线的制备

为了除去 1.5.1 过程中加入的大量的 NaBH<sub>4</sub> 溶液,研究采用了反相 C18 SPE 的手段纯化和浓缩了 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub>。SPE 小柱分别用 5 mL 0.1% 甲酸甲醇,

5 mL 0.1% 的甲酸水溶液激活,然后准确量取 5 mL 转化后的样品缓慢上柱,上样后先用 5 mL 0.1% 的甲酸水溶液冲洗柱,采用 1 mL 0.1% 甲酸甲醇缓慢洗脱,收集洗脱成分后,以 0.1% 甲酸甲醇为空白,测定各转化后的 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub> 在波长 290 nm 处的紫外吸光度值。根据公式 Lambert-Beer 定律,  $A = \zeta bc$ , 其中  $\zeta$  代表摩尔消光系数 (31.7 μmol/L·cm);  $b$  代表比色皿厚度,为 1 cm;  $c$  代表浓度;  $A$  代表吸光值;从而得到计算各样品浓度。准确量取不同体积的 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub> 的标准品,并分别加入 100 μL PteGlu<sub>(1-6)</sub> 作为内标,用 100 mmol/L 的醋酸铵的缓冲溶液(含 1% 的抗坏血酸, pH=7.84) 定容到 10 mL,从而得到不同浓度的工作溶液并进行 UPLC-MS/MS 分析。

#### 1.6 叶酸的提取及转化成 5-甲基-四氢叶酸的 形式

叶酸的提取参考文献中的报道<sup>[12]</sup>,提取最关键的一步是钝化内源性多聚谷氨酸水解酶,以保证在提取过程中四棱豆中的叶酸保持内源性状态。称取 5 g 新鲜四棱豆样品,切成约 2 cm 长小块,于 50 mL 锥形瓶中,加入 25 mL 叶酸提取缓冲液(100 mmol/L 醋酸铵的缓冲溶液,含 1% 的抗坏血酸,0.1% 二硫苏糖醇, pH=7.4),迅速地沸水中加热 10 min 使多聚谷氨酸水解酶失活,取出样品,用碎冰将其完全冷却到室温,接着用匀浆机将完全匀浆后,再于沸水中加热 10 min,取出样品,冷却,抽滤,将滤液定容到 25 mL,于 -20 ℃ 冰箱保存备用。由于天然叶酸形式多样,主要形式为

5-甲基四氢叶酸 (5MTHF), 为了简化蔬菜内多聚谷氨酸叶酸分布及总叶酸的分布, 我们将各种形式的叶酸全转化为 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub>, 转化原理及步骤依据文献的报道<sup>[11]</sup>。

转化步骤: 取 5 mL 提取液, 加入 500 μL 标准 5-甲基四氢叶酸(78 μmol/L), 再加入 15 mL 66 mmol/L pH=7.8 Tris 缓冲液(含 2 g 抗坏血酸钠), 1 mL 2-辛醇, 10 mL 120 g/L 的 NaBH<sub>4</sub>, 振荡混匀, 静置 10 min; 用 5 mol/L CH<sub>3</sub>COOH 调至 pH=7.4; 加入 37% 甲醛 80 μL, 然后振荡 30 s 以混匀, 30 s 内加入 10 mL 120 g/L 的 NaBH<sub>4</sub>, 然后用 37% 浓 HCl 调 pH 至 0.85, 静置 10 min; 用 5 mol/L NaOH 调 pH 至 5, 再加 10 mL 120 g/L NaBH<sub>4</sub>, 振荡均匀, 静置 20 min; 用 Tris 缓冲液定容到 100 mL; 将分层后上层的 2-辛醇去除后。取 5 mL 上清液过 0.45 μm 滤膜后, 滤液过反相 C18 SPE 柱除盐。其中 100 μL 洗脱液中, 加入 100 μL PteGlu<sub>(1-6)</sub> 内标, 然后进行 UPLC-MS/MS 测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 UPLC-MS/MS 条件的优化

流动相的选择对于色谱柱的分离至关重要, 由于采用 MS / MS 对目标化合物进行定性和定量分析时, 通过选定目标物对应的离子, 即可对该物质单独进行分析, 而且各物质的离子通道互不干扰, 因此本方法选择流动相时不必过多考虑样品中共流物的影响。参照文献报道<sup>[12]</sup>, 以 0.1% 甲酸水(A)和乙腈(B)为流动相, 分离效果不好, 且分子量大的几种 5-甲基四氢叶酸灵敏度很低。优化后采用 10 mmol/L 乙酸铵(含 0.2% 的乙酸)-乙腈 (50:50, V/V) 为流动相进行等度洗脱, 6 种叶酸峰形、对称性均良好, 干扰物少, 各待测组分的灵敏度很高, 3 min 内就能完成检测。基于此, 在电喷雾正离子方式下对 6 种叶酸物质 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub> 进行一级质谱分析(Q1 扫描), 得到分子离子(母离子), 对化合物的分子离子进行二级质谱分析(子离子扫描), 得到碎片离子信息, 即子离子, 然后优化 6 种 5-甲基

四氢叶酸二级质谱参数, 使得特征碎片离子强度达到最大时为最佳, 得到每种化合物的二级质谱图; 按照二级质谱图提供的碎片离子信息, 6 种 5-甲基四氢叶酸的定量离子, 其多反应监测谱见图 2。

### 2.2 方法学的验证

研究对方法的回收率、最低检测限、最低定量限、精密度和准确度进行了验证。各种 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub> 回收率为 20%~90%, 最低检测限接近相关的研究<sup>[12]</sup>。采用 UPLC-MS/MS 测定总叶酸和多聚谷氨酸叶酸分布时, 存在基质效应问题, 影响最终结果的准确性和重复性。为消除基质效应的影响, 我们加入了内标 PteGlu<sub>(1-6)</sub>。加入内标后, 方法的重复性得到极大提高, 同一天精密度为 0.5% 至 7.5%, 隔天精密度为 1% 至 8%。各种 5-甲基四氢叶酸校正数据见表 2 和表 3。

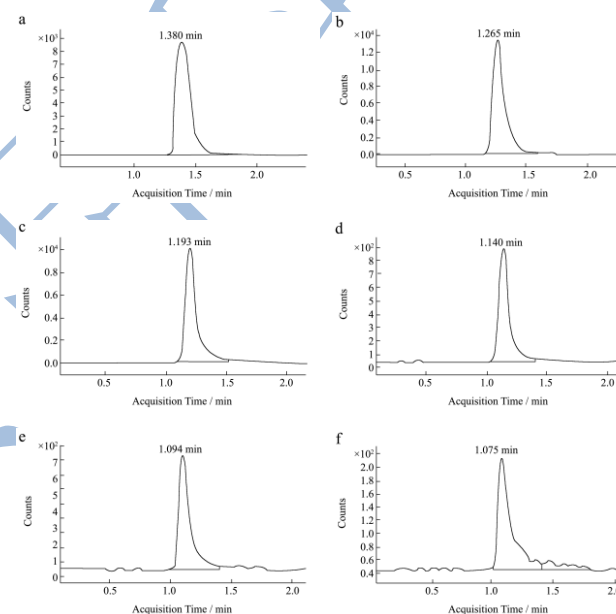


图 2 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub> MRM 色谱图

Fig.2 Chromatograms of polyglutamyl 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub> in MRM Mode

注: a. 5MTHFGlu<sub>1</sub>; b. 5MTHFGlu<sub>2</sub>; c. 5MTHFGlu<sub>3</sub>; d. 5MTHFGlu<sub>4</sub>; e. 5MTHFGlu<sub>5</sub>; f. 5MTHFGlu<sub>6</sub>。

表 2 六种 5-甲基-四氢叶酸的线性关系, 检出限, 定量限和回收率

Table 2 Linear relationships, limits of detections, limits of quantifications, recoveries for six 5MTHF

化合物名称	检出限/fmol	定量限/fmol	回收率/%	相关系数	线性范围/(上样量/pmol)
5-甲基-四氢蝶酰单谷氨酸 (5MTHFGlu <sub>1</sub> )	100	300	42	0.997	0.3-57
5-甲基-四氢蝶酰二谷氨酸 (5MTHFGlu <sub>2</sub> )	40	120	88	0.997	1~60
5-甲基-四氢蝶酰三谷氨酸 (5MTHFGlu <sub>3</sub> )	49	150	37	0.997	1~63
5-甲基-四氢蝶酰四谷氨酸 (5MTHFGlu <sub>4</sub> )	110	330	20	0.997	1~48
5-甲基-四氢蝶酰五谷氨酸 (5MTHFGlu <sub>5</sub> )	633	1900	50	0.997	2~117
5-甲基-四氢蝶酰六谷氨酸 (5MTHFGlu <sub>6</sub> )	1133	3400	23	0.997	3~187

表 3 六种 5-甲基-四氢叶酸精密度和准确度

Table 3 Precisions and accuracies for six 5MTHF compounds

化合物名称	样品水平/pmol	隔天		当天	
		精密度/%	准确度/%	精密度/%	准确度/%
5MTHFGlu <sub>1</sub>	0.3~114	0.5	91.6	1.1	90.5
5MTHFGlu <sub>2</sub>	1~60	4.5	93.5	5.9	92.7
5MTHFGlu <sub>3</sub>	1~63	5.1	96.3	5.5	95.2
5MTHFGlu <sub>4</sub>	1~48	7.0	98.4	7.7	96.5
5MTHFGlu <sub>5</sub>	2~117	7.4	92.1	6.8	92.3
5MTHFGlu <sub>6</sub>	3~187	6.8	99.3	5.2	98.7

### 2.3 四棱豆中 5-甲基-四氢叶酸的检测

利用本研究建立的分析方法,对提取的叶酸样品内 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub> 的种类和含量进行测定,结果见图 4 及表 4。5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub> 的定性基于与标准品的保留时间进行对照确定。从分析结果来看,四棱豆中叶酸的主要形式为 5MTHFGlu<sub>1</sub> 和 5MTHFGlu<sub>5</sub>, 其中 5MTHFGlu<sub>5</sub> 含量最高,占到总叶酸量的 65%, 这与菠菜及莴苣<sup>[12]</sup>中叶酸分布情况一致;新鲜四棱豆总叶酸含量为 1.1 μmol/100g, 高于西南花、芥蓝, 菠菜等蔬菜<sup>[12]</sup>; 5MTHFGlu<sub>(2,6)</sub> 占总叶酸量的 70%。

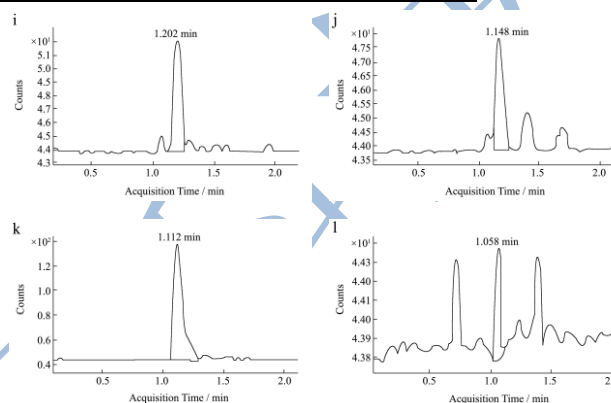


图 4 四棱豆中 5-甲基四氢叶酸的 MRM 色谱图

Fig.4 Chromatograms of polyglutamyl 5MTHFGlu<sub>(1-6)</sub> in *Psophocarpus tetragonolobus* D.C extract in MRM mode

注: g. 5MTHFGlu<sub>1</sub>; h. 5MTHFGlu<sub>2</sub>; i. 5MTHFGlu<sub>3</sub>; j. 5MTHFGlu<sub>4</sub>; k. 5MTHFGlu<sub>5</sub>; l. 5MTHFGlu<sub>6</sub>。

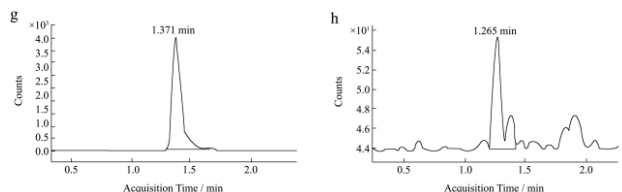


表 4 四棱豆中各种叶酸的含量及分布

Table 4 Content and distributions of 5MTHF monoglutamate and polyglutamate in *Psophocarpus tetragonolobus* D.C (μmol/100 g)

叶酸种类	5MTHFGlu <sub>1</sub>	5MTHFGlu <sub>2</sub>	5MTHFGlu <sub>3</sub>	5MTHFGlu <sub>4</sub>	5MTHFGlu <sub>5</sub>	5MTHFGlu <sub>6</sub>	叶酸总量
含量/(μmol/100 g)	0.3250	0.0151	0.0168	0.0240	0.7121	0.0056	1.1
占总含量百分比/%	29.58	1.38	1.53	2.18	64.81	0.51	100

### 3 结论

本研究建立了准确高效的 UPLC-MS/MS 方法定量分析四棱豆中总叶酸和多聚谷氨酸叶酸分布。本方法把所有不同形式的叶酸转化为 5-甲基四氢叶酸的形式,简化了分析方法,提高了叶酸含量分析的准确性,分析时间小于 3 min。该方法灵敏度高,最低检测限为 40~1133 fmol,最低定量限为 120~3400 fmol,精密度的 0.5%~6.8%,平均回收率为 43%,相关系数 R<sup>2</sup>>0.997。研究发现四棱豆中多聚谷氨酸叶酸的主要形式是蝶酰五谷氨酸,占叶酸总量的 65%;其次是蝶酰单谷氨酸占 30%。该法的建立不仅填补了四棱豆中叶酸种类及含量的空白,也为蔬菜及水果等复杂介质中叶酸的检测提供了技术支持。

### 参考文献

[1] De La Garza RD, Quinlivan EP, Klaus SMJ, et al. Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of folate synthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(38): 13720-13725

[2] Doherty R, Beecher G. A method for the analysis of natural and synthetic folate in foods [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 354-361

[3] Perla A Ramos-Parra, Carolina Garc á-Salinas, Carmen Hernández-Brenes, et al. Folate levels and polyglutamylation profiles of papaya (carica papaya cv. maradol) during Fruit Development and Ripening [J]. Journal of Agricultural and

- Food Chemistry, 2013, 61: 3949-3956
- [4] De Steur H, Gellynck X, Storozhenko S, et al. Health impact in China of folate-biofortified rice [J]. *Nature biotechnology*, 2010, 28(6): 554-556
- [5] Li Z, Ren A, Zhang L, et al. A population-based case-control study of risk factors for neural tube defects in four high-prevalence areas of Shanxi province, China [J]. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 2006, 20: 43-53
- [6] Houghton LA, Gray AR, Rose MC, et al. Long-term effect of low-dose folic acid intake: potential effect of mandatory fortification on the prevention of neural tube defects [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2011, 94: 136-141
- [7] Anderson CAM, Jee SH, Charleston J, et al. Effects of folic acid supplementation on serum folate and plasma homocysteine concentrations in older adults: a dose-response trial [J]. *American Journal of Epidemiology*, 2010, 172: 932-941
- [8] Hanson AD, Gregory JF. Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2011, 62: 105-125
- [9] Molloy AM, Scott JM. Microbiological assay for serum, plasma, and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method [J]. *Methods in Enzymology*, 1997, 281: 43-53
- [10] Patring JDM, Jastrebova JA, Hjortmo SB, et al. Development of a simplified method for the determination of folates in baker's yeast by HPLC with ultraviolet and fluorescence detection [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(7): 2406-2411
- [11] Ndaw S, Bergaentzle M, Aoude-Werner D, et al. Determination of folates in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after precolumn conversion to 5-methyltetrahydrofolates [J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 928(1): 77-90
- [12] 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
- [13] Adamec J, Jannasch A, Huang JJ, et al. Development and optimization of an LC-MS/MS-based method for simultaneous quantification of vitamin D-2, vitamin D-3, 25-hydroxyvitamin D-2 and 25-hydroxyvitamin D-3 [J]. *Journal of Separation Science*, 2011, 34(1): 11-20
- [14] 曾宪远, 宁焕焱, 尹艳, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定花生及制品中的五种真菌毒素[J]. *现代食品科技*, 2014, 1(30): 217-221
- ZENG Xian-yuan, NING Huan-yan, YIN Yan, et al. Determination of five mycotoxins in peanuts and products by HPLC-MS/MS [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 1(30): 217-221
- [15] Rainer G. Composition and protein quality of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) [J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1983, 32(2): 117-124
- [16] Mnembuka BV, Eggum BO. Comparative nutritive value of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC) and other legumes grown in Tanzania [J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1995, 47(4): 333-339
- [17] Sathe SK, Deshpande SS, Salunkhe DK. Functional properties of winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC] proteins [J]. *Journal of Food Science*, 1982, 47: 503-509