

叶酸的光化学行为及其应用

赵慧春*, 张田蕾, 张铁莉, 冯瑞琴

(北京师范大学化学系, 北京 100875)

摘要 目的:研究叶酸的光化学行为并提出测定叶酸的光化学荧光分析方法。方法:叶酸在六次甲基四胺-盐酸介质中,经 365 nm 紫外光照射后,发生光化学反应,产物的荧光强度(λ_{ex} 280 nm, λ_{em} 443 nm)较叶酸本身的增大了 25 倍。根据光化学反应产物的荧光强度测定叶酸的含量。结果:叶酸的浓度在 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,荧光强度与浓度呈良好的线性关系,检出限为 $1.5 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,相对标准偏差为 1.6%。结论:本方法适用于片剂中叶酸的测定。

关键词 光化学荧光光度法;叶酸

叶酸(folic acid)亦称维生素 Bc,蝶呤的衍生物,其分子由蝶啶、对氨基苯甲酸及谷氨酸组成,是抗贫血药,主要用于巨幼红细胞性贫血,也可用于恶性贫血的辅疗药物。本品在人体内参与氨基酸及核酸的合成,并能与维生素 B₁₂ 共同促进红细胞的生成。

用高效液相色谱法^[1,2]、分光光度法^[3]、吸附溶出伏安法^[4]、微生物放射法^[5]、荧光衍生法^[6,7]测定叶酸的含量已见报道,但用光化学荧光法测定叶酸的含量至今未见报道。叶酸稀溶液的荧光较弱,直接荧光法测定灵敏度很低,但叶酸在六次甲基四胺-盐酸介质中经紫外光照射后,荧光强度增大了 25 倍,极大地提高了荧光法测定的灵敏度。此法突出的特点是简便、无需外加试剂、稳定性及重现性好、灵敏度高。

实 验 部 分

仪器及试剂 日立 850 荧光分光光度计,岛津 UV-250 紫外分光光度计, pH-S-2 型酸度计(上海第二分析仪器厂), ZFI 型三用紫外分析仪(上海顾村电光仪器厂)。

叶酸(中国药品生物制品检定所)标准溶液($1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$):称取纯叶酸 44.14 mg 加 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液数滴溶解,于 100 ml 量瓶中定容。避光($0 \sim 4^\circ\text{C}$)冷藏保存。使用时用水逐级稀释

为所需浓度。试剂均为分析纯,水为二次重蒸水。

实验方法 取适量叶酸标准溶液于 10 ml 具塞刻度试管中,加入 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ 缓冲溶液(pH 5.2) 1.0 ml,用水稀释至 10 ml,摇匀。在 365 nm(辐照度为 $30 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$)紫外光下照射 40 min 后,放置 10 min。在激发波长为 280 nm、发射波长为 443 nm、激发通带和荧光通带分别为 8 nm 和 10 nm 条件下,以试剂为参比测定其相对荧光强度。

结 果

1 吸收光谱及荧光光谱

叶酸体系的吸收光谱和荧光光谱如图 1 和图 2 所示。

由吸收光谱(图 1)可见,叶酸本身在 240 nm, 280 nm, 350 nm 有 3 个吸收峰。当加入 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ 缓冲溶液后其 240 nm 的吸收峰消失,且经紫外光照射后,280 nm 处吸收峰明显降低,365 nm 处吸收峰略有紫移且峰强度有所升高,可见光照后体系发生了化学反应。由图 2 可见,体系的激发光谱和吸收光谱相似,光照与不光照体系的荧光光谱峰位基本不变,但叶酸在 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ 介质中光照后,体系的荧光强度大大提高了。叶酸浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,光照与不光照体系的荧光强度相差 25 倍,说明光照后有强荧光物质生成。测定时选择激发波长为 280 nm、荧光波长为 443 nm,测定光照体系的荧光强度。

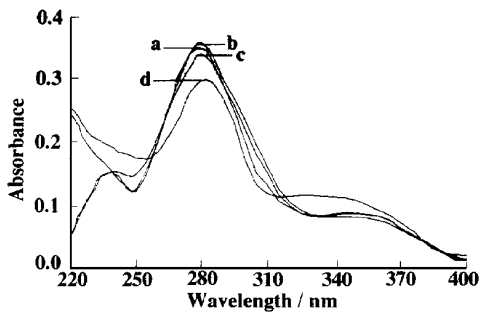


Fig 1 Adsorption spectra of folic acid. Concentration of folic acid: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. a. Folic acid, no irradiation; b. Folic acid + $(\text{CH}_2)_6 \text{N}_4^- \text{HCl}$, no irradiation; c. Folic acid, with irradiation; d. Folic acid + $(\text{CH}_2)_6 \text{N}_4^- \text{HCl}$, with irradiation.

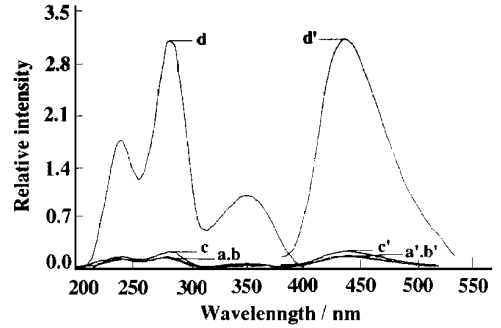


Fig 2 Excitation and emission spectra of folic acid. Concentration of folic acid: $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. a, a'. Folic acid, no irradiation; b, b'. Folic acid + $(\text{CH}_2)_6 \text{N}_4^- \text{HCl}$, no irradiation; c, c'. Folic acid, with irradiation; d, d'. Folic acid + $(\text{CH}_2)_6 \text{N}_4^- \text{HCl}$, with irradiation.

2 酸度及缓冲溶液的选择

试验了 pH 2 ~ 10 不同缓冲体系 HCl, HAc-NaAc, $(\text{CH}_2)_6 \text{N}_4^- \text{HCl}$, $\text{NH}_4\text{Ac}-\text{NH}_3$, NH_4Ac , $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 和 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7-\text{NaOH}$ 对叶酸荧光强度的影响。发现, 只有在 $(\text{CH}_2)_6 \text{N}_4^- \text{HCl}$ 介质中叶酸经光照后其荧光强度才明显增大。实验选用 $(\text{CH}_2)_6 \text{N}_4^- \text{HCl}$ 缓冲体系来控制溶液的 pH 值。pH 值对荧光强度的影响如图 3 所示。由图可见, pH 5 ~ 6 时荧光强度值大且稳定。实验时选择 pH 5.2 的 $(\text{CH}_2)_6 \text{N}_4^- \text{HCl}$ 缓冲

介质, 确定其用量以 1.0 ml 为宜。

3 光照时间的影响

将配好的溶液避光放置 2 d, 荧光强度变化很小。同样的溶液在日光下放置时, 发现随放置时间的增长荧光强度逐渐增大。将其置于 365 nm (辐照度为 $30 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) 紫外灯下照射, 荧光强度随时间变化的关系曲线如图 4 所示。由图可见, 光照 40 min 后荧光强度趋于平稳, 而且放置 50 h 后其荧光值基本不变, 故实验时选择光照时间为 40 min。

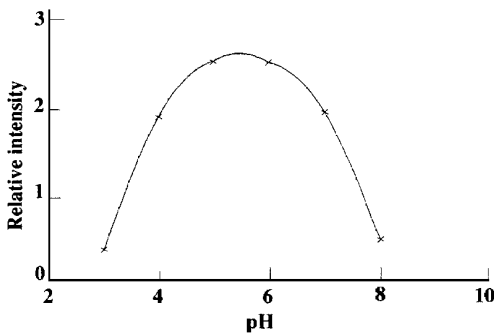


Fig 3 Effect of pH of buffer solution on relative intensity. Concentration of folic acid: $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

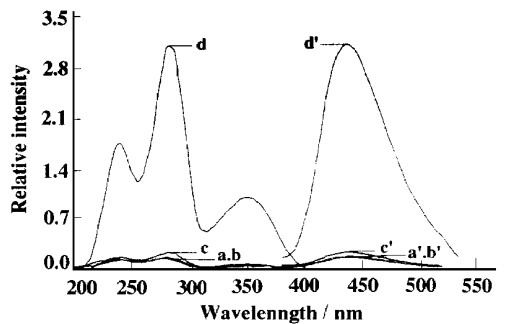


Fig 4 Effect of irradiation time on relative intensity. Concentration of folic acid: $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (irradiation intensity: $30 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$).

4 干扰试验

以误差 5% 为限, 100 倍的 V_{BI} 和 20 倍的 Al^{3+} 及 Zn^{2+} 等常见离子对测定无干扰, Vc 对叶酸的测定有严重的干扰。

5 工作曲线

叶酸浓度为 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 荧光强度 ΔF 与浓度 C ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 呈良好的线性关系。当叶酸浓度为 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其线性回归方程为:

$$\Delta F = 0.0229 + 3.24 \times 10^6 C, \quad y = 0.9998$$

当叶酸浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其线性回归方程为:

$$\Delta F = 0.0788 + 3.07 \times 10^6 C, \quad r = 0.9996$$

6 精密度及检出限

按实验方法平行测定 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 叶酸标准溶液 10 份的相对荧光强度, 计算相对标准偏差为 1.6%, 说明方法的重现性良好。

按照 IUPAC 规定(3 s) 测定 11 份试剂空白溶液^[8], 得到此法的检出下限为 $1.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

7 样品测定

取叶酸片剂(标示量为每片含叶酸 5 mg) 10 片, 研细混匀。称取相当于一片药片的质量, 加入 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 1 ml 充分搅拌, 再加水稀释过滤, 洗涤滤渣数次并于 500 ml 量瓶中定容, 然后取 25.00 ml 定容于 250 ml 量瓶中, 即为样品溶液。取适量的样品溶液按实验方法测定, 用工作曲线法测得片剂中叶酸含量每片为 5.03 mg ($n = 3$), 相当于标示值的 100.6%。标准加入法测得回收率为 (99.5 ~ 106.5)%(表 1)。实验结果表明, 片剂中的淀粉、糊精等辅料对测定无干扰。

Tab 1 Recovery experiments ($n = 3$)

Folic acid added / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Folic acid found / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Recovery / %
0	0.23	
0.20	0.44	106.5
0.40	0.64	102.5
0.60	0.83	99.5
0.80	1.03	100.0
1.00	1.23	100.0

按片剂配比, 精密称取叶酸纯品及辅料适量, 混匀, 按上述方法操作, 测得回收率为 100.4% ($n = 3$), 测定结果表明该方法准确可靠。

讨 论

由叶酸体系的吸收光谱和荧光光谱的变化可知, 叶酸在 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ 介质中经紫外光照射后发生了光化学反应, 有强荧光物质产生。为了探讨 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ 介质在光化学反应中的作用, 试验了叶酸光照前和光照后加入 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ 时体系的荧光强度的变化情况。发现光照前加入 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ 的体系其荧光强度比不加 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ 的增大了 25 倍, 而光照后再加 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ 的体系其

荧光强度与不加 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ 的基本一致, 说明叶酸的光化学反应只有在 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ 存在的条件下才能发生。由此可见, 体系中的 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ 不仅起到了缓冲溶液的作用, 而且还促进了光化学反应的进行。

以硫酸奎宁 ($0.20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ 溶液) 为标准物 ($Q = 0.55$), 测定了 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ (pH 5.2) 介质中叶酸不光照和光照后体系的相对荧光量子效率 (Q), 测得值分别为 0.0022 和 0.153。显然, 光照后所得产物比叶酸具有更强的荧光。

据 Wittle 等报道^[9], 叶酸与 KMnO_4 反应生成强荧光产物蝶呤 ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_5\text{O}_3$), 其荧光强度比叶酸增大很多。本实验采用紫外灯作光化学反应的光源, 叶酸光化学反应产物的紫外吸收光谱等实验现象与报道的很类似, 因此我们推测在 $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ (pH 5.2) 介质条件下, 叶酸光照后生成了强荧光物质蝶呤。

参 考 文 献

- 1 时绢, 胡树静. 用高效液相法测定叶酸的含量. 药物分析杂志, 1985, 5: 226
- 2 Schieffer GW, Wheeler GP, Cimino CO. Determination of folic acid in commercial diets by anion-exchange solid-phase extraction and subsequent reversed-phase HPLC. *J Liq Chromatogr*, 1984, 7: 2659
- 3 Reddy MN, Viswanadham N, Sastry CSP. Spectrophotometric methods for the determination of folic acid. *Indian Drugs*, 1984, 21: 460
- 4 Le Gall AC, Van den Berg CMG. Determination of folic acid in sea water using adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Anal Chim Acta*, 1993, 282: 459
- 5 Chen MF, Hill JW, McInyre PA. The folacin contents of foods as measured by a radiometric microbiologic method. *J Nutr*, 1983, 113: 2192
- 6 Cruces BC, Segura CA, Ferna' ndez GA, et al. Fluorometric determination of folic acid based on its reaction with the fluorogenic reagent fluorescamine. *Anal Lett*, 1994, 27: 1339
- 7 Cruces BC, Segura CA. Micellar-enhanced synchronous-derivative fluorescence determination of derivatized folic acid in pharmaceutical preparations. *J Pharm Biomed Anal*, 1995, 13: 1019
- 8 郑用熙. 分析化学中的数理统计方法. 北京: 科学出版社, 1991. 116
- 9 Wittle EL, O' Dell BL, Vandenbelt JM, et al. Oxidative degradation of vitamin Bc (pteroylglutamic acid). *J Am Chem Soc*, 1947, 69: 1786

PHOTOCHEMICAL BEHAVIOUR OF FOLIC ACID AND ITS APPLICATION

Zhao Huichun(Zhao HC) , Zhang Tianlei(Zhang TL) , Zhang Tieli(Zhang TL) and Feng Ruiqin(Feng RQ)

(*Department of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875*)

ABSTRACT **AIM:** To study the photochemical behaviour of folic acid and establish a photochemical fluorimetric method for folic acid determination. **METHODS:** In $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4\text{-HCl}$ medium, a photochemical reaction takes place on irradiation of the folic acid with 365 nm ultraviolet light. The photochemical product showed an intense fluorescence intensity (λ_{ex} 280 nm, λ_{em} 443 nm), which was 25 times higher than that of the original folic acid. On this basis, the determination of folic acid was carried out. **RESULTS:** The linear relationship between the fluorescence intensity and concentration of folic acid is over the range of $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the detection limit is $1.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and relative standard deviation is 1.6%. The recoveries are in the range of (99.5 ~ 106.5)%. **CONCLUSION:** It can be applied to the determination of folic acid in tablets.

KEY WORDS photochemical fluorimetry; folic acid