

# 叶酸的能​​量转移荧光测定法及其应用

郭蒙<sup>a\*</sup> 杨景和<sup>b</sup>

(<sup>a</sup>潍坊学院化学化工学院 潍坊 261061; <sup>b</sup>山东大学化学与化工学院 济南)

**摘要** 报道了一种灵敏检测叶酸的荧光新方法。在叶酸-KMnO<sub>4</sub>-Eu<sup>3+</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>体系中,以 pH = 4.7 的乙酸-乙酸钠(浓度为 0.2 mol/L)为缓冲溶液,利用高锰酸钾和过氧化氢将叶酸氧化形成蝶呤-6-羧酸,与 Eu<sup>3+</sup> 配位成配合物,该配合物被激发后,蝶呤-6-羧酸通过分子内能量转移将吸收的能量传递到 Eu<sup>3+</sup>,从而发射出 Eu<sup>3+</sup> 的特征荧光。在 4 × 10<sup>-8</sup> ~ 4 × 10<sup>-5</sup> mol/L 范围内, Eu<sup>3+</sup> 的荧光强度与叶酸的浓度呈线性关系,相关系数为 0.9902,检测限达到 1.2 × 10<sup>-8</sup> mol/L。用于实际样品中叶酸的检测,得到了满意的结果。

**关键词** 叶酸,铕,荧光

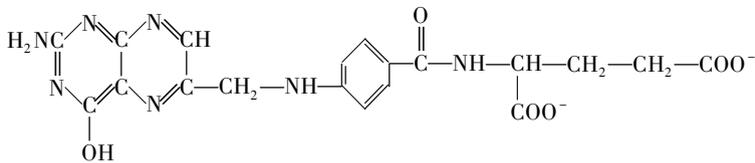
中图分类号:O657

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2011)01-0101-06

DOI:10.3724/SP.J.1095.2011.00174

叶酸(folic acid)亦名维生素 Bc,在碱性或中性环境溶液中对热稳定,但在光照(尤其是紫外线)或酸性条件下易分解,其结构式如下:



叶酸是一种抗贫血药,主要用于巨幼红细胞性贫血,也用于恶性贫血的辅助治疗。同时,叶酸有望成为抗癌治疗靶点,用于肿瘤诊断<sup>[1-3]</sup>。因此建立灵敏的叶酸测定方法具有十分重要的意义。

目前常用的叶酸检测方法有:分光光度法、电化学法、高效液相色谱法、微生物法和荧光法等,但是这些方法灵敏度和选择性较低<sup>[4-10]</sup>。由于稀土元素具有光谱线宽较窄、激发态寿命长、stocks 位移大、与生物分子结合能力强等优点,常用于核酸<sup>[11-12]</sup>、蛋白质<sup>[13-14]</sup>和药物<sup>[15-16]</sup>等的定量测定。本文报道的新荧光检测叶酸的方法,是将叶酸用高锰酸钾氧化形成蝶呤-6-羧酸,再与 Eu<sup>3+</sup> 结合成配合物,该配合物被激发后,蝶呤吸收的能量通过分子内能量转移传递到 Eu<sup>3+</sup>,从而发射 Eu<sup>3+</sup> 的特征光谱。该测定方法利用分子内能量转移将荧光发射峰由紫外区移至可见光区,避免了在紫外区的干扰,快速而且灵敏,选择性较强。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

LS-55 型荧光分光光度计(美国 PE 公司),激发和发射狭缝宽度均为 10 nm,波长扫描速度为 500 nm/min;pHS-3B 型精密酸度计;UV-240 型紫外吸收分光光度计(日本 Shimadzu 公司)。

三氧化二铕(99.99%);叶酸(98%,美国 Sigma 公司);高锰酸钾(99.5%);过氧化氢(30%);叶酸片,标示值 5 mg/片;所用试剂均为分析纯或生物纯,用三次蒸馏水配制。

### 1.2 实验方法

在 25 mL 的比色管中,依次加入一定体积的叶酸溶液,3.0 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液,0.1 mL 高锰

酸钾溶液,摇匀,在80℃恒温水浴中加热4 min,取出后迅速加入0.2 mL 过氧化氢溶液,剧烈振摇,冷却后加入1 mL  $\text{Eu}^{3+}$  溶液,稀释至10 mL。静置5 min后,用1 cm 比色皿在激发波长343 nm、发射波长620 nm处测定体系的相对荧光强度  $I_f(\%)$  (与最大荧光强度之比)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 缓冲溶液及 pH 值

溶液的酸碱度对体系荧光强度的影响如图1所示。从图1可以看出,当溶液的pH值在 $4.70 \pm 0.10$ 时,体系的荧光强度值  $I_f$  达到最大。在此pH值范围内,研究了乙酸-乙酸钠、磷酸氢二钠-柠檬酸、柠檬酸-柠檬酸钠、BR溶液、甲酸-氢氧化钠和HMTA-HCl等缓冲溶液对体系荧光强度的影响。结果表明,乙酸-乙酸钠缓冲溶液效果最好,其体积以3.0 mL为宜。

### 2.2 氧化剂的选择

由于  $\text{Eu}^{3+}$  的荧光是由叶酸吸收能量后通过分子内能量转移后而发射的,故在选择氧化剂时仅考虑叶酸发射的荧光。在所使用的氧化剂高锰酸钾、过氧化氢及高锰酸钾和过氧化氢中,将高锰酸钾和过氧化氢结合使用时荧光发射效果最好。由于高锰酸钾是过量的,导致溶液颜色加深,影响测定,故用  $\text{H}_2\text{O}_2$  还原剩余的高锰酸钾。 $\text{KMnO}_4$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的最佳浓度分别为1和10 mmol/L。

### 2.3 温度和加热时间的影响

在HAc-NaAc (pH = 4.7, 0.2 mol/L) 3.0 mL、 $\text{KMnO}_4$  1.0 mmol/L、叶酸  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L、 $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mmol/L、 $\text{Eu}^{3+}$  1.0 mmol/L 条件下,当温度为60、70、80和90℃时,荧光强度  $I_f$  分别为89.3%、98.7%、100%和99.1%,可见最佳温度为80℃。加热时间的影响如图2所示。从图2可以看到,在80℃时加热4 min为宜。

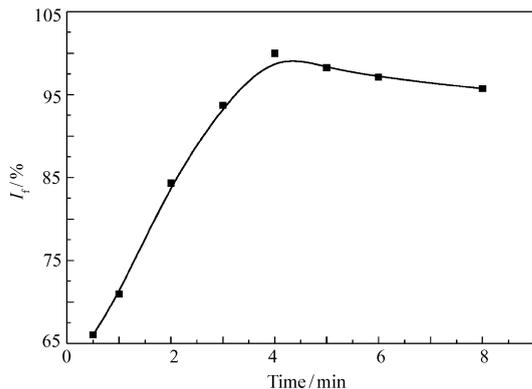


图2 80℃下加热时间对荧光强度的影响

Fig. 2 Effect of the heating time at 80℃ on the fluorescence intensity

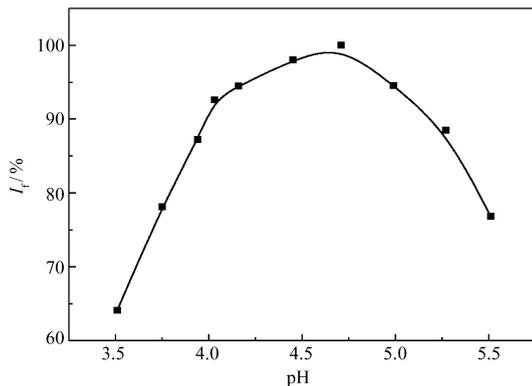


图1 pH值对荧光强度的影响

Fig. 1 Effect of pH values on the fluorescent intensity  $V(\text{HAc-NaAc}) = 3.0 \text{ mL}$ ;  $c(\text{KMnO}_4) = 1 \text{ mmol/L}$ ;  $c(\text{folic acid}) = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ;  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 10 \text{ mmol/L}$ ;  $c(\text{Eu}^{3+}) = 1 \text{ mmol/L}$

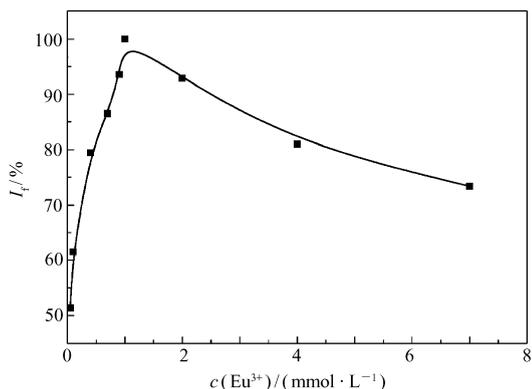


图3  $\text{Eu}^{3+}$  浓度对荧光强度的影响

Fig. 3 Effect of the concentration of  $\text{Eu}^{3+}$  on the fluorescent intensity

$V(\text{HAc-NaAc}(\text{pH} = 4.7, 0.2 \text{ mol/L})) = 3.0 \text{ mL}$ ;  $c(\text{KMnO}_4) = 1 \text{ mmol/L}$ ;  $c(\text{folic acid}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ;  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 10 \text{ mmol/L}$

## 2.4 $\text{Eu}^{3+}$ 浓度的影响

$\text{Eu}^{3+}$  浓度对体系荧光强度的影响见图3。从图3可见,体系的荧光强度随着  $\text{Eu}^{3+}$  浓度的增加而增大,当  $\text{Eu}^{3+}$  浓度为 1 mmol/L 时,体系的荧光强度达到最大值,此后呈现出下降的趋势。

## 2.5 稳定性

在最佳实验条件下,当体系各组分在室温下混合孵化 5 min 后,荧光强度达到最大值,且在 1.5 h 内基本不变。

## 2.6 干扰离子

在最佳实验条件下,相对误差为  $\pm 5\%$  的范围内常见的离子所允许的最大浓度如表1所示。从表1可见,除  $\text{Fe}^{3+}$  外,大部分物质无明显干扰。

表1 干扰物质的影响  
Table 1 Tolerance of coexisting salts

Coexisting salts	Concentration coexisting/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Change of $\Delta I_f/\%$
KCl	46	-4.8
$\text{Al}(\text{NO}_3)_3$	30	-4.6
NaCl	100	-4.8
$\text{CaCl}_2$	20	-5.3
$\text{ZnSO}_4$	14	-5.4
$\text{CuCl}_2$	20	-4.1
$\text{FeCl}_3$	5	-3.4
$\text{MgCl}_2$	18	-5.1
D-glucose	10	-3.9
Citric acid	12	-4.7
$\text{V}_c$	42	-4.8
$\text{V}_{b6}$	36	-5.2

$V(\text{HAc-NaAc}(\text{pH}=4.7, 0.2 \text{ mol/L})) = 3.0 \text{ mL}$ ;  $c(\text{KMnO}_4) = 1 \text{ mmol/L}$ ;  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 10 \text{ mmol/L}$ ;  $c(\text{folic acid}) = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ;  $c(\text{Eu}^{3+}) = 1 \text{ mmol/L}$ 。

## 2.7 在分析叶酸样品中的应用

2.7.1 工作曲线与检出限 在最佳实验条件下,体系的荧光强度与叶酸的浓度在一定范围内呈线性关系,其回归方程为  $I_f = 11.7147 + 5.9672 \times 10^6 c$ , 相关系数为 0.9902, 线性范围为  $4.0 \times 10^{-8} \sim 4.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ , 检出限为  $1.2 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。由此法与其它荧光法的灵敏度比较(表2)可见,本法的灵敏度较高,线性范围较宽。

表2 荧光检测方法比较

Table 2 The fluorescence comparison of this method with other methods

Method	Linear range/ $(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Detection limit/ $(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Literature
$\text{H}_2\text{O}_2$	$0 \sim 1.3 \times 10^{-5}$	$1.2 \times 10^{-5}$	7
$\text{KMnO}_4$		$1.7 \times 10^{-6}$	8
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	$1 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-5}$	$3.0 \times 10^{-7}$	9
$\text{KMnO}_4$	$1.7 \times 10^{-8} \sim 1.4 \times 10^{-6}$	$1.0 \times 10^{-8}$	10
This method	$4 \times 10^{-8} \sim 4 \times 10^{-5}$	$1.2 \times 10^{-8}$	

2.7.2 叶酸片中叶酸的测定 取 10 片叶酸片剂(由叶酸、淀粉、乳糖、硬脂酸镁等组成)在研钵中研细

表3 叶酸样品的检测

Table 3 Detection of folic acid in actual sample

Sample	Method	Average of concentration/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	RSD/ $\%$
Folic acid	This method	2.27	5.3
	HPLC	2.25	5.3

$V(\text{HAc-NaAc}(\text{pH}=4.7, 0.2 \text{ mol/L})) = 3.0 \text{ mL}$ ;  $c(\text{KMnO}_4) = 1 \text{ mmol/L}$ ;  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 10 \text{ mmol/L}$ ;  $c(\text{Eu}^{3+}) = 1 \text{ mmol/L}$ 。

混匀,称取 5 mg 粉末,加入适量 0.1 mol/L 的氨水充分溶解,过滤洗涤,用水定容至 50 mL,稀释后进行测定。取平行测定 5 次的平均值,结果如表 3 所示。从表 3 可以看出,这种方法的准确度和精密度均比较满意。

## 2.8 反应机理

体系的激发和发射光谱如图 4 所示。从图 4 可以看出,在 pH=4.70 的乙酸-乙酸钠缓冲溶液中,激发波长为 343 nm 时,在 595 和 620 nm 处有 2 个发射峰,分别对应于  $\text{Eu}^{3+}$  的  ${}^5D_0-{}^7F_1$  和  ${}^5D_0-{}^7F_2$  跃迁。

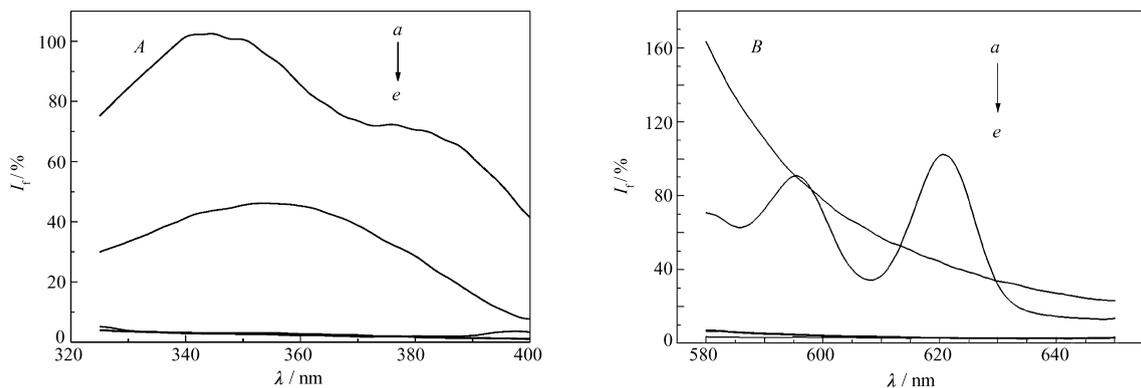


图 4 激发光谱(A)和发射光谱(B)

Fig. 4 Excitation(A) and emission spectra(B)

*a.* folic acid-KMnO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Eu<sup>3+</sup>; *b.* folic acid-KMnO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; *c.* Eu<sup>3+</sup>; *d.* folic acid; *e.* folic acid-Eu<sup>3+</sup>; V(HAc-NaAc(pH=4.7, 0.2 mol/L))=3.0 mL; c(KMnO<sub>4</sub>)=1 mmol/L; c(folic acid)=1.0 × 10<sup>-5</sup> mol/L; c(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)=10 mmol/L; c(Eu<sup>3+</sup>)=1 mmol/L

叶酸本身的荧光较弱,其溶液在酸性条件下,经加热被高锰酸钾氧化,生成了蝶呤-6-羧酸<sup>[17]</sup>,从而发射出较强的荧光。图 5 为叶酸-高锰酸钾-过氧化氢的荧光光谱。从图 5 可以看出, folic acid-KMnO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中加入 Eu<sup>3+</sup> 后,蝶呤-6-羧酸的荧光强度显著降低。从吸收光谱(图 6)也可看出,加入 Eu<sup>3+</sup> 后,吸收峰发生了蓝移,而且吸收强度增加,这充分说明二者之间形成了配合物。通过摩尔比法对其配比测定,结果如图 7 所示,其拐点在摩尔比 7:3 处,说明配合物的组成约为 2:1,其可能结构如 Scheme 1 所示。

从图 5 可以看出,当 Eu<sup>3+</sup> 加入到叶酸-KMnO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中时,蝶呤-6-羧酸的荧光强度减弱,而 Eu<sup>3+</sup> 的荧光强度则增强(见图 4B)。因此,可以认为当配合物被激发时,蝶呤-6-羧酸吸收了能量后又通过分子内能量转移传递给 Eu<sup>3+</sup>,从而使体系发射出 Eu<sup>3+</sup> 的特征荧光峰。

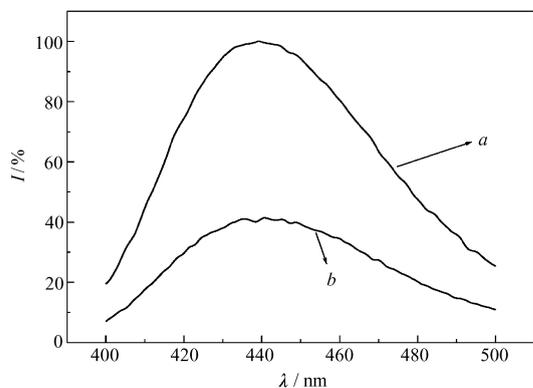


图 5 叶酸-高锰酸钾-过氧化氢的荧光光谱

Fig. 5 Fluorescent spectrum of folic acid-KMnO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

other conditions see Fig. 4

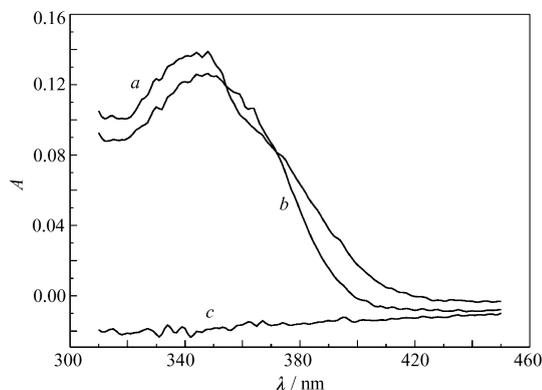


图 6 叶酸-高锰酸钾-过氧化氢体系的吸收光谱

Fig. 6 Absorption spectra of folic acid-KMnO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*a.* folic acid-KMnO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Eu<sup>3+</sup>; *b.* folic acid-KMnO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; *c.* Eu<sup>3+</sup>

other conditions see Fig. 4

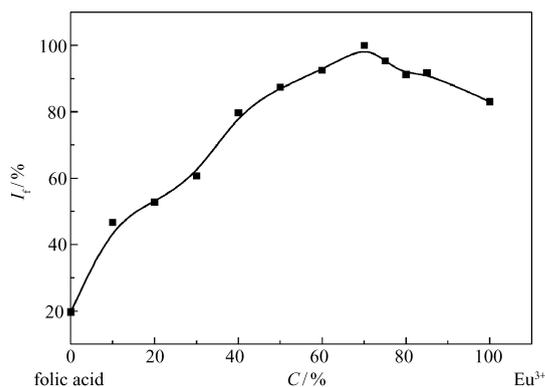
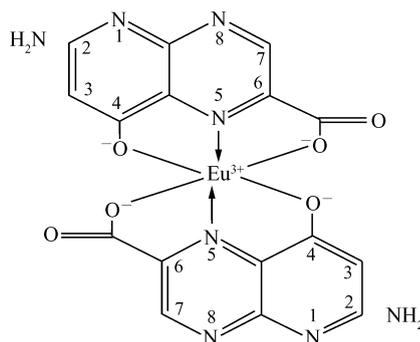
图7 摩尔比法测定叶酸与Eu<sup>3+</sup>的配比

Fig. 7 Determination of ratio of folic acid to Eu<sup>3+</sup> using the molar ratio method



Scheme 1 Structure of complex

### 3 结 论

叶酸氧化后形成蝶呤-6-羧酸,可与Eu<sup>3+</sup>形成配合物,该配合物将吸收的能量通过分子内能量转移传递给Eu<sup>3+</sup>,从而发射Eu<sup>3+</sup>的特征荧光,据此建立了荧光测定叶酸的新方法。在HAc-NaAc(pH=4.7, 0.2 mol/L) 3.0 mL、KMnO<sub>4</sub> 1 mmol/L、叶酸1.0 × 10<sup>-5</sup> mol/L、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mmol/L、Eu<sup>3+</sup> 1 mmol/L条件下,体系的荧光强度与叶酸的浓度在4 × 10<sup>-8</sup> ~ 4 × 10<sup>-5</sup> mol/L范围内呈线性关系,检测限达到1.2 × 10<sup>-8</sup> mol/L。

### 参 考 文 献

- [1] WANG Jinbang, GU Peng, ZHANG Dehong, *et al.* The Research Progress in Analysis Methods of Folic Acid[J]. *China Food Add*, 2000, **3**:49-54 (in Chinese).  
汪锦邦, 顾鹏, 章德宏, 等. 叶酸分析方法的研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2000, **3**:49-54.
- [2] Duthie S J, Narayana S, Gillian M B, *et al.* Impact of Folate Deficiency on DNA Stability[J]. *J Nutr*[J], 2002, **132**: 2448-2449.
- [3] Gruner B A, Weitman S D. The Folate Receptor as a Potential Therapeutic Anticancer Target[J]. *Invest New Drugs*, 1998, **16**:205-219.
- [4] ZHAN Ying, LIU Sijie, GU Xiaoli, *et al.* Determination of Folic Acid in Food by High Performance Liquid Chromatography [J]. *Chinese J Public Health Eng*, 2007, **6**(5):289-290 (in Chinese).  
战英, 刘思洁, 顾小莉, 等. 高效液相色谱法测定保健食品中的叶酸[J]. *中国卫生工程学*, 2007, **6**(5):289-290.
- [5] WANG Fumi. Electrochemistry Actuality of Research on Folate[J]. *Chem Ind Times*, 2003, **17**(6):4-7 (in Chinese).  
王福民. 叶酸电化学测定的研究现状[J]. *化工时刊*, 2003, **17**(6):4-7.
- [6] CHEN Suming, ZHANG Zhujun, YANG Chunyan, *et al.* Flow Injection-electrochemical Oxidation Fluorimetry for Determination of Folic Acid[J]. *Chinese J Anal Lab*, 2006, **25**(11):15-19 (in Chinese).  
陈素明, 章竹君, 杨春艳, 等. 流动注射-电化学氧化荧光法测定叶酸[J]. *分析实验室*, 2006, **25**(11):15-19.
- [7] LIU Xin, HUANG Hanguo. Fluorimetric Determination of Folic Acid in Tablets Using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as Oxidant[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2002, **30**(8):1018 (in Chinese).  
刘欣, 黄汉国. 过氧化氢氧化-荧光分光光度法测定片剂中叶酸含量[J]. *分析化学*, 2002, **30**(8):1018.
- [8] REN Nailin, WEI Jieshan, HAN Daxiong. Determination of Folic Acid in Tablet Using Potassium Persulfate as Oxidant [J]. *Chinese J Spectrosc Lab*, 2004, **21**(5):909-912 (in Chinese).  
任乃林, 魏洁珊, 韩大雄. 过硫酸钾氧化-荧光分光光度法测定片剂中叶酸的含量[J]. *光谱实验室*, 2004, **21**(5):909-912.
- [9] LIU Xin, HUANG Hanguo. Fluorimetric Determination of Folic Acid in Tablets Using Potassium Permanganate as Oxidant [J]. *Chinese J Anal Chem*, 2000, **28**(11):1406-1409 (in Chinese).

- 刘欣,黄汉国. 高锰酸钾氧化-荧光光度法测定片剂中叶酸含量[J]. 分析化学,2000,**28**(11):1406-1409.
- [10] HUANG Chunbao,PAN Zuting. A Study on Oxidation Reduction Reaction of Folic Acid with Potassium Permanganate and Its Application[J]. *J Huangguang Norm*,2000,**20**(3):27-29(in Chinese).
- 黄春保,潘祖亭. 高锰酸钾-叶酸氧化还原反应的研究及应用[J]. 黄冈师范学院学报,2000,**20**(3):27-29.
- [11] Tong C L,Hu Z,Liu W P. Enoxacin-Tb<sup>3+</sup> Complex as an Environmentally Friendly Fluorescence Probe for DNA and Its Application[J]. *Talanta*,2007,**71**(2):816-821.
- [12] Tong C L,Hu Z,Liu W P. Sensitive Determination of DNA Based on the Interaction Between Norfloxacin-Tb<sup>3+</sup> Complex and DNA[J]. *J Agric Food Chem*,2005,**53**(16):6207-6212.
- [13] Sun C X,Yang J H, Wu X. The Fluorescent Enhancement Effect in Terbium-Gadolinium-Protein-Cetylpyridine Bromide System and Its Application for the Determination of Protein at Nanogram Level[J]. *Chem Phys Lett*,2004,**398**(4/6):343-350.
- [14] Sun C X,Yang J H, Wu X, *et al.* Study on the Fluorescent Enhancement Effect in Terbium-Gadolinium-Protein-Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate System and Its Application on Sensitive Detection of Protein at nanogram Level[J]. *Biochimie*,2004,**86**(8):569-578.
- [15] Tong C L, Xiang G H. Sensitive Determination of Norfloxacin by the Fluorescence Probe of Terbium(III)-Sodium Dodecylbenzene Sulfonate and Its Luminescence Mechanism[J]. *J Fluoresc*,2006,**16**(6):831-837.
- [16] Tong C L,Xiang G H,Liu W P. Study on the Determination of Ciprofloxacin by the Terbium(III) Ion Fluorescence Probe Sensitized by the Surfactant[J]. *Spectrosc Spectr Anal*,2005,**25**(12):2061-2064.
- [17] Wittle E L,O'Dell B L,Vandenbelt J M, *et la.* Oxidative Degradation of Vitamin Bc(pteroylglutamic acid)[J]. *J Am Chem Soc*,1947,**69**(7):1786.

## A Fluorescent Energy Transfer Method and Its Application in the Detection of Folic Acid

GUO Meng<sup>a\*</sup>, YANG Jinghe<sup>b</sup>

(<sup>a</sup>*School of Chemistry and Chemical Engineering, Weifang University, Weifang 261061;*

<sup>b</sup>*School of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Ji'nan)*

**Abstract** The detection of folic acid by a fluorescent energy transfer method has been developed. In the folic acid-KMnO<sub>4</sub>-Eu<sup>3+</sup>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system with the presence of HAc-NaAc buffer solution(pH = 4.7, 0.2 mol/L), the folic acid can be oxidized by KMnO<sub>4</sub> with the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and converted into the purine of butterfly-6-carboxyl acid, which can coordinate with Eu<sup>3+</sup> forming a complex. The experimental conditions including the concentration of buffer solution and pH value, choice of oxidant, the temperature and heating time, the concentration of Eu<sup>3+</sup>, *etc.*, were optimized. This system can emit the characteristic fluorescence of Eu<sup>3+</sup> through an intra-molecule energy transfer process. The fluorescent intensity is in proportional to the concentration of folic acid in the range of  $4 \times 10^{-8} \sim 4 \times 10^{-5}$  mol/L with correlation coefficient of 0.9902. The detection limit is found to be  $1.2 \times 10^{-8}$  mol/L. The developed method has been successfully applied to the determination of folic acid in the actual samples.

**Keywords** folic acid, Eu, fluorescence