

# 叶酸结构性质、测定与应用

杨 洁

(安徽冶金科技职业学院 安徽马鞍山 243011)

**摘 要:** 叶酸是一种水溶性维生素,在饲料、食品与临床医学等领域有着广泛的应用。从叶酸的结构、理化性质、来源、检测方法与应用等方面,对叶酸进行全面的阐述,并对叶酸的研究趋势做出预测。

**关键词:** 叶酸; 结构; 检测方法; 应用

中图分类号: Q563+.8 文献标识码: B 文章编号: 1672-9994(2012)04-0039-04

叶酸是维生素 B 复合体之一,它有促进骨髓中幼细胞成熟的作用,可改善血管内皮功能、预防心血管疾病。人类如缺乏叶酸可引起巨红细胞性贫血以及白细胞减少症。本文从叶酸的结构性质、来源、检测方法与应用等方面进行全面的分析阐述。

## 1 叶酸的结构与性质

### 1.1 叶酸结构

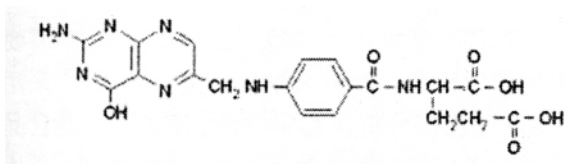


图 1 叶酸结构

叶酸又称维生素 M,是含有蝶酰谷氨酸结构的一类化合物的总称,属于 B 族维生素。1930 年 Wills 与 Meht 发现“孕妇贫血”问题与从肝和酵母中的一种物质有关,通过猴实验证实这种物质对贫血有治疗作用,经过近十多年时间才分离、提取这一物质。1948 年用降解法与合成法测定了其结构式, Mitchell 等命名其为“叶酸”,由蝶呤啶、对氨基苯甲酸与 L-谷氨酸结合而成,其结构图 1 所示<sup>[1]</sup>。

### 1.2 叶酸理化性质<sup>[2]</sup>

叶酸为深黄色或橙色结晶化物,无臭无味。它微溶于冷水和乙醇,溶于热水、乙酸钠性溶液,极易

溶于丙酮,不溶于乙醚、氯仿及苯。叶酸在中性或碱溶液中对热稳定,加热到 100℃,1 h 也不改变,而在酸性溶液中不稳定,热或感光照射时,更易分解破坏。

## 2 叶酸的来源

叶酸广泛分布于绿色蔬菜中,其他蔬菜如,土豆、南瓜、豆类中也有较高的含量,一些水果中也含有一定量的叶酸。动物性食品中,动物内脏、蛋类、鱼类、牛奶、乳制品、肉类中也广泛存在叶酸。王旋等人在《营养大讲堂之叶酸》<sup>[3]</sup>中引用了《中国食物成分表 2002》部分常见食物中叶酸的含量,具体见表 1。

表 1 常见食物叶酸含量(每 100g 含量)

食物	菠菜	芦笋	豌豆	香蕉	柑橘	辣椒	鸡蛋	猪 虾
含量 /mg	87.9	18.2	82.6	20.2	26.4	69.4	113.3	335.2 26.4

另外,为了追求更低的成本和扩大产量,国内外的一些科研学者也在微生物产叶酸方面进行了研究,例如 Uwe Sauer 等人<sup>[4]</sup>研究枯草芽孢杆菌代谢产叶酸的能力, N. Domagalski 等人<sup>[5]</sup>通过分子生物学方法分析了提高枯草芽孢杆菌代谢产叶酸量的方法。荷兰的 Wilbert Sybesma 等人<sup>[6,7]</sup>研究了影响乳酸菌产叶酸的各种培养条件,并讨论用代谢工程增加叶酸产品, Arno Wegkamp 等人<sup>[8]</sup>研究了乳酸菌产叶酸的表征作用。

## 3 叶酸的检测方法

叶酸的检测分析方法很多,不同的方法用于不

收稿日期: 2012-04-28; 改回日期: 2012-09-10

作者简介: 杨洁(1983-)女,2007年毕业于安徽工程大学生物工程专业。安徽冶金科技职业学院护理系,教师。

同样品中叶酸的测定。本文就叶酸存在形式的不同,对叶酸的测定方法进行归类分析。

### 3.1 叶酸纯品的测定方法

叶酸纯品测定,所需仪器与检测方法相对简单,主要有3种方法<sup>[9]</sup>,具体如下:

#### 3.1.1 紫外分光光度法

紫外分光光度法测定原理为:叶酸在0.1 mol/L 氢氧化钠中具有最大吸收作用,可采用260 nm 与283 nm 处叶酸最大吸收峰来定量分析叶酸含量,此方法适用于大部分实验室。

#### 3.1.2 直接比色法

叶酸与Folin-Cioalten试剂作用(碱性介质,室温)时,叶酸的分解产物对氨基苯甲酰谷氨酸与F-C试剂作用变蓝色,在760 nm 处有最大吸收峰,在4.4 μg/ml - 44 μg/ml 范围内符合Beer定律,可进行叶酸含量的测定。

#### 3.1.3 茚三酮比色法

茚三酮比色法的原理为:叶酸能被盐酸和锌粉还原为2,4,5-三氨基-羟基嘧啶(TAHP),再与茚三酮反应,生成稳定的紫色络合物,然后通过比色法测定叶酸含量。杨玉柱等人<sup>[9]</sup>研究表明此法形成的紫色络合物在波长555 nm 处有最大吸收峰,可作用吸收波长,叶酸浓度在4.5 μg/ml - 45 μg/ml 范围内符合Beer定律,可作为叶酸定量分析测定范围。

### 3.2 保健食品中叶酸的测定方法

各种样品中成分复杂,叶酸的测定也比较复杂。保健食品中的叶酸含量的测定方法很多,主要有高效液相色谱法、高效液相柱后衍生法、单扫描示波极谱法等。

#### 3.2.1 高效液相色谱法(HPLC)

高效液相色谱法的特点<sup>[10]</sup>是测定结果准确、操作简便、省时省力、分析速度快、分离效果好,是近年来发展速度较快的测定叶酸的方法。分析操作方法和所用药品分析相似:称取磨细的样品置于离心管中,加入流动相液体,超声波提取15 min - 30 min。取出后加入流动相定容,摇匀后过滤,滤液用HPLC法分析。常用高效液相色谱仪有日本岛津LC-10A、SPD-10A和SCL-6A,检测波长 $\lambda = 280$  nm,柱温40℃。吉林省卫生监测中心的战英等人<sup>[11]</sup>对HPLC的流动相进行了选择分析,选择出甲醇+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、KOH水溶液为流动相,当流

动相的pH为6.3时,分离时间、分离效果都比较好。湖北邵生文,王艳等人<sup>[12]</sup>采用高效液相色谱法分析叶酸时表明,叶酸含量为0.5 μg/mL - 50 μg/mL 时,测定值与真实值具有良好的线性关系。此外,张春燕,顾健<sup>[13]</sup>采用反相高效液相色谱法进行叶酸测定。

#### 3.2.2 高效液相柱后衍生法

高效液相柱后衍生法的特点是操作简单、快捷、灵敏,满足日常分析。广州市疾病预防控制中心刘莉洁等人<sup>[14]</sup>采用高效液相柱后衍生法测定出了婴儿保健食品中叶酸的含量,他们在实验中选用了含12% 乙腈+88% 0.05 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液(pH=3.5)作为流动相,流速1 ml/min,经ODS C-18反相色谱柱分离,柱温设为40℃,以0.5% K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>溶液为衍生剂,流速为0.3 ml/min,反应温度为60℃,使用荧光检测器检测定量,激发波长为365 nm,发射波长为450 nm,并用外标法测定了叶酸的含量,结果显示测定线性范围能达到40 μg/L - 500 μg/L,相关系数R<sub>2</sub>为0.9992,最低定量检测限为28.72 μg/L,平均回收率能达到86.6% - 96.0%,相对标准偏差为1.5%。

#### 3.2.3 单扫描示波极谱法

单扫描示波极谱法的特点是操作简单,不需要昂贵的仪器设备。集美大学的彭爱红等人<sup>[15]</sup>采用JP-303型极谱分析仪测定叶酸,建立了保健食品中叶酸的单扫描二阶导数示波极谱测定方法,并用正交试验确定了叶酸测定的最佳底液条件。在B-R(Britton-Robinson)缓冲体系(pH=7.22)中,叶酸产生一灵敏的极谱还原波,峰电位E<sub>p</sub> = -0.89 V(vs. SCE),其二阶导数波峰电流与叶酸浓度(3 × 10<sup>-7</sup> mol/L - 5 × 10<sup>-6</sup> mol/L)呈线性关系,线性方程I<sub>p</sub> = 59.441c + 9.627,相关系数R<sub>2</sub> = 0.9991,检出极限为3 × 10<sup>-7</sup> mol/L。

#### 3.2.4 叶酸的平行催化波法

平行催化波法简单灵敏,易于操作。中南民族大学赵晶瑾等人<sup>[16]</sup>发现在Britton-Robinson(pH4.1)的缓冲溶液中叶酸于-0.56 V(vs. SCE)产生一还原波,该波能被氧化剂过硫酸钾催化形成平行催化波。催化波峰电位不变,峰电流增加10倍,二阶导数波波高与叶酸的浓度在5.0 × 10<sup>-9</sup> mol/L - 3.5 × 10<sup>-7</sup> mol/L 范围内呈线性关系(R<sub>2</sub> = 0.999),检出极限可达3.0 × 10<sup>-9</sup> mol/L,并

运用该法测定了叶酸片剂中的叶酸含量。

### 3.2.5 微生物测定法

微生物测定法的特点是灵敏度高,样品中被测物含量极低时也能被测出。样品处理简单,不需要一系列的提纯步骤,前处理操作步骤简单。西南大学的杨玉柱等人研究发现,粪链球菌和酪乳酸杆菌(简称 LC)可用于叶酸检测,但微生物分析法周期比较长,实验步骤复杂,不符合当前要求分析方法快速、高效和简便的要求,而且微生物测定法只能对食物中的总叶酸含量进行测定,因此微生物测定法的应用受到限制。

## 3.3

### 3.3 临床中叶酸含量的测定方法

#### 3.3.1 电化学发光法测定血清中叶酸含量

电化学发光法操作简便、特异性强、灵敏度高、结果准确可靠,适用于临床有关血清叶酸的常规测定。卫生部的肖路延等人<sup>[17]</sup>采用电化学发光法测定血清叶酸含量,以三联吡啶作标记物,包被叶酸结合蛋白,标记叶酸和待测标本中的叶酸竞争性结合包被好的叶酸结合蛋白,通过外电场作用产生化学发光反应,测定出血清中叶酸的含量。结果发现本法线性范围为 1.21 nmol/L - 38.80 nmol/L,批间和批内的变异系数分别为 2.4% 和 1.5%,回收率为 100%,测定结果与放射免疫法测定结果具有良好的相关性,两种方法测定结果无显著性差异。

#### 3.3.2 核素放射免疫法测定早孕妇女红细胞叶酸含量与放射免疫法比较

此法具有自动程度高、无污染、灵敏度高等优点,结果更加可靠。浙江医学报刊登出了沈国松等人<sup>[18]</sup>的实验,他们采用时间分辨荧光免疫技术,利用检测试剂盒测定出了孕妇红细胞中的叶酸含量。

#### 3.4 蔬菜中痕量叶酸含量的衍生荧光法测定方法

首都师范大学贾蕊等人<sup>[19]</sup>详细研究了叶酸内在荧光,  $H_2O_2$ -光照、 $KMnO_4$ -光照荧光体系,结果显示,叶酸的内在荧光比较弱,而用衍生方法进行测定时,其灵敏度可提高 2-3 个数量级。在所研究的三种体系中,  $KMnO_4$ -光照法具有较好的灵敏度和较宽的线性范围,可用于绿色蔬菜样品中叶酸的测定,标准回收率为 92.5% - 95.0%,达到了理想的结果。

## 4 叶酸的应用

随着叶酸功能的不断被发现,全球“叶酸热”也正处于持续升温阶段,叶酸将在人类和动物的健康方面起着不可估量的作用。出叶酸的主要功能和应用主要体现在以下几个方面。

### 4.1 饲料方面

目前畜牧业饲养中,多用高蛋白、高能量配合饲料进行集中饲喂,而这些饲料中维生素缺乏。苗淑彦等人<sup>[20]</sup>提出叶酸缺乏,雏鸡的免疫力会下降。雏鸡的血涂片观察发现,叶酸添加量较高时,T 细胞含量较缺乏组和低剂量添加组均明显升高 ( $P < 0.05$ ),雏鸡死亡率显著下降。在母猪粮中添加 24 mg/kg 叶酸,可使其仔猪更加健康而且母猪的窝产仔数和仔猪存活率都提高<sup>[21]</sup>。

### 4.2 食品方面

叶酸作为维生素,是人体不可缺少的营养元素之一,对人体(特别是占人群较大比例的孕妇、乳母、婴幼儿)新陈代谢起着不可忽视的作用。除膳食中补充富含叶酸的食物外,具有高剂量的天然型叶酸药品及叶酸保健品也是人体被充叶酸的重要途径。美国食品与医药管理(FDA)局从 1998 年 1 月 1 日起,就开始实施谷物制品必须强化叶酸的规定,目前美国已开发出一些新型营养强化食品如叶酸牛奶、叶酸口香糖等<sup>[22]</sup>。在我国含叶酸的儿童强化食品也正在推出市场,中国的叶酸市场前景也非常广阔<sup>[23]</sup>。

### 4.3 临床应用

白建刚<sup>[24]</sup>详细阐述了叶酸在临床上所发挥的作用,另外关于营养中缺乏叶酸导致疾病的事实也屡见不鲜,日常生活中最常见的叶酸缺乏病症有三种。一是巨幼红细胞贫血症,机体缺乏叶酸导致红细胞内 DNA 合成减少,细胞分裂和增殖时间延长,致使红细胞胞体过大而形成巨幼红细胞;二是高同型半胱氨酸尿症,叶酸缺乏导致同型半胱氨酸浓度升高,使细胞形成动脉粥样斑与血凝块,造成管腔狭窄和闭塞,从而诱发急性心脑血管疾病;三是新生儿神经管畸形,孕妇若摄入叶酸严重不足,会使胎儿的 DNA 合成发生障碍,细胞分裂减弱,其脊柱的关键部位发育受损,导致脊柱裂。据报道妇女在怀孕的前 6 周内若摄入叶酸不足,其生出无脑儿和脑脊柱裂的畸形儿的可能性增加 4 倍。

## 5 结论

目前对叶酸的结构与性质已比较清楚,叶酸的检测方法也很多,适应于不同存在形式的叶酸分析。叶酸具有广泛的应用价值,加快开展对样品中叶酸的快速、准确的检测方法研究,对富含叶酸的食品与保健食品的研发工作,已成为广大科研学者、医学工作人员等的当务之急。希望通过大家的共同努力,彻底消除叶酸缺乏病,人类和动物的生命健康提高到一个更新的水平!

## 参考文献

- [1] 曹能,李璋. 叶酸在人体内作用的研究进展[J]. 生物学通报, 2003, 38(2): 20-21
- [2] 黄新河,莫宏春,刘克武. 叶酸及其应用[J]. 四川食品与发酵, 2003, 4(39): 27-30
- [3] 王璇. 营养大讲堂之叶酸[J]. 饮食科学, 2003, 7: 10-11
- [4] Uwe Sauer, Douglas C. Cameron, James E. Bailey. Metabolic Capacity of *Bacillus subtilis* for the Production of Purine Nucleoside, Riboflavin, and Folic acid[J]
- [5] T. Zhu, Z. Pan, N. Domagalski, R. Koepsel, M. M. Atai, M. M. Domach. Engineering of *Bacillus subtilis* for Enhanced Total Synthesis of Folic Acid[J]. 2005, 7
- [6] Wilbert Sybesma, Marjo Starrenburg, Linda Tijsseling. Effects of Cultivation Conditions on Folate Production by Lactic Acid Bacteria[J]. 2003, 4
- [7] Wilbert Sybesma, Marjo Starrenburg, Michiel Kleerebezem, Increased Production of Folate by Metabolic Engineering of *Lactococcus lactis*[J]. 2003, 3
- [8] Arno Wegkamp, Wietske van Oorschot, Willem M. de Vos, and Eddy J. Smid. Characterization of the Role of para-Aminobenzoic Acid Biosynthesis in Folate Production by *Lactococcus lactis*[J]. 2007, 2
- [9] 杨玉柱等. 叶酸的研究进展[J]. 农产品加工·学刊, 2006, 5, 31-35
- [10] 邵桃玉,赵国琦. 高效液相色谱法测定维生素的研究[J]. 饲料工业, 2007, 28(18): 55-57
- [11] 战英,刘思洁. 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
- [12] 邵生文,王艳. 高效液相色谱法测定复合维生素胶囊中叶酸含量[J]. 中国民康医学, 2007, 19(7): 591-592
- [13] 张春燕,顾健. 反相高效液相色谱法同时测定人血浆中亚叶酸、5-甲基四氢叶酸及甲氨蝶呤的浓度及临床应用[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(7): 543-547
- [14] 刘莉治,罗晓燕等. 高效液相色谱法测定婴幼儿食品中的叶酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(7): 1179-1180
- [15] 彭爱红,胡凤兰. 单扫描示波极谱法测定保健食品中的叶酸[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2004, 9(4): 329-331
- [16] 赵晶瑾,韩甜甜等. 叶酸的平行催化波及其分析应用[J]. 分析试验室, 2007, 26(6): 44-46
- [17] 肖路延,王萌,朱明炜等. 电化学发光法测定血清叶酸[J]. 中国临床营养杂志, 2006, 12(6): 75-78
- [18] 沈国松. 早孕妇女红细胞叶酸含量测定及其临床意义[J]. 浙江医学报, 2007, 29(8): 814-815
- [19] 贾蕊,安会梅,朱若华. 衍生荧光法测定蔬菜样品中痕量叶酸含量的研究和应用[J]. 首都师范大学学报, 2006, 27(1): 59-62
- [20] 苗淑彦,麦康森. 叶酸的营养研究及应用[J]. 饲料工业, 2007, 28(18): 39-41
- [21] 余有贵. 叶酸的营养研究现状与展望[J]. 邵阳学院学报, 2002, 1(2): 96-98
- [22] 柴多里,马云峰. 叶酸[J]. 精细与专用化学品, 2001, 23: 13-14
- [23] 孙辉. 叶酸市场分析与发展前景[J]. 现代化工, 2003, 23(4): 50-52
- [24] 白建刚. 叶酸临床应用研究进展[J]. 中国实用医药, 2007, 2(6): 30-31

## Folic Acid Structure Properties, Determination and Application

YANG Jie

**Abstract:** Folic acid is a water-soluble vitamin, in feed, food and medicine and other fields have a wide range of applications. This article from the folic acid structure, physicochemical properties, sources, detection method and application areas such as folic acid, to conduct a comprehensive exposition, and folic acid research forecast.

**Key words:** folic acid; structure; detection method; application