

Н. А. АНДРЕЕВА и В. Н. БУКИН

ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

(Представлено академиком А. И. Опариным 6 XI 1948)

Как известно, фолиевой кислотой называется группа веществ, обладающих различным физиологическим действием и особенностями строения, но объединяемых по своим химическим свойствам присутствием пиразино-пиримидинового кольца, которое обуславливает специфический спектр этих соединений, их окислительно-восстановительные свойства и способность давать интенсивную голубую флуоресценцию в ультрафиолетовом свете. Учитывая эти свойства, мы попытались разработать химический метод суммарного определения этих веществ в естественных продуктах, относительно чего никаких указаний в литературе не имеется.

Попытки использовать характерный спектр абсорбции фолиевой кислоты в ультрафиолетовом свете не дали положительных результатов, поэтому мы обратились к изучению ее флуоресцирующих свойств. В своих опытах мы пользовались препаратом основного вещества фолиевой кислоты (птероилглутаминовой кислоты), чистота которого спектроскопически была установлена в 98,7%, исходя из опубликованных ⁽¹⁾ коэффициентов экстинкции. Ввиду отсутствия данных о спектре флуоресценции фолиевой кислоты мы прежде всего измерили его *. На основании спектра флуоресценции, приведенного на рис. 1, мы подобрали светофильтр с максимумом пропускаемости света при 470 мμ и границами общей пропускаемости, в пределах которых проходит 95% света, от 455 до 500 мμ.

Так как интенсивность флуоресценции обычно в сильной мере зависит от pH среды, мы определили влияние этого фактора. На рис. 2 показана зависимость интенсивности флуоресценции при трех различных концентрациях фолиевой кислоты, которая однозначно указывает наиболее благоприятную область ее изменения между pH 4 и pH 5. В этих пределах интенсивность флуоресценции фолиевой кислоты почти не меняется и, следовательно, небольшие колебания pH не отражаются на точности ее измерений. Следует отметить, что интенсивность флуоресценции подчиняется закону пропорциональности Лямберта — Бера.

Решающим моментом для методики определения фолиевой кислоты оказалась возможность очистки ее экстрактов от посторонних веществ с помощью адсорбции. Из всех обычных адсорбентов наиболее пригодным оказался активированный уголь марки СТ, предварительно обработанный раствором анилина по Вильямсу ⁽²⁾ для уменьшения прочности адсорбции фолиевой кислоты и облегчения ее эволюции. Оказалось, что с помощью этого приема удается отделить многие флуоресцирующие примеси, в том числе рибофлавин, и в значительной мере повысить специфичность метода.

* Выражаем благодарность акад. А. Н. Теренину за содействие в измерении спектра.

Попытки использовать прием тушения флуоресценции, аналогично тому, как делается при определении рибофлавина, не дали положительных результатов, но обработка экстрактов перманганатом калия оказалась необходимой. Ниже дается описание флуорометрического метода определения фолиевой кислоты.

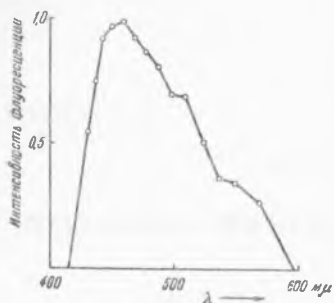


Рис. 1

Навеска материала берется с таким расчетом, чтобы в вытяжке, идущей на определение, содержалось 2—3 $\mu\text{г}$ фолиевой кислоты в 1 мл. Обычные навески для этого составляют 1—2 г для дрожжей и печени, 5 г для зерновых продуктов и 10—15 г для зеленых частей растений, овощей и фруктов. Навеска материала тщательно растирается с кварцевым песком, переносится в колбу, заливается 75 мл 40% метафосфорной кислоты и выдерживается

на кипящей водяной бане 45 мин. После охлаждения объем доводится до 100 мл и вытяжка фильтруется. На дальнейшую обработку берется 50—75 мл фильтрата с точным учетом объема.

Для адсорбции фолиевой кислоты добавляется 100 мг предварительно подготовленного активированного угля. Вытяжка доводится до кипения, кипятится при помешивании 5 мин., уголь отфильтровывается под вакуумом на фильтре Шотта № 3 и далее поступает на элюцию. Подготовка угля для адсорбции ведется следующим образом: навеска угля заливается 10-кратным количеством 10% водного раствора свежеперегнанного и освобожденного от флуоресцирующих примесей анилина. Обработка ведется 1 час при кипячении и непрерывном помешивании, после чего уголь отфильтровывается, промывается 5—6 раз дистиллированной водой на воронке Бюхнера, сушится тонким слоем при 30—40° и хранится в закрытой банке. Уголь, на котором адсорбировалась фолиевая кислота, обрабатывается на том же фильтре Шотта 5 раз горячим (60—70°) 30% раствором аммиака в 70% этиловом спирте. Спирт предварительно проверяется на отсутствие флуоресценции. Общее количество элюирующей смеси 70 мл, из них на первую обработку берется 20 мл, на вторую и третью по 15 мл, на четвертую и пятую по 10 мл.

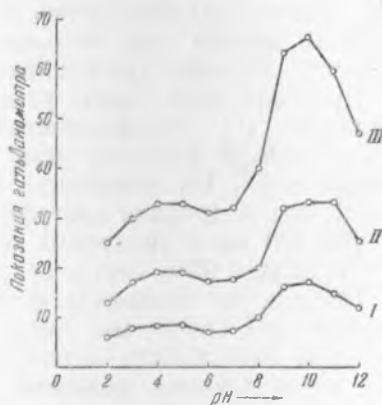


Рис. 2

Соединенные порции элюата помещаются в перегонную колбу со стеклянным шлифом и отгоняются примерно до 10—15 мл, после чего pH доводится 25% уксусной кислотой до 3,0 и экстракт подвергается обработке KMnO_4 . Для обработки применяется 4% раствор KMnO_4 , который по каплям добавляется до исчезающей розовой окраски. Смесь выдерживается 10 мин., к концу которых она несколько буреет, но слабо розовый оттенок сохраняется. После этого добавляется по каплям 3% перекись водорода до обесцвечивания, pH доводится до 4—4,5, замеряется объем и смесь фильтруется.

Фильтрат поступает на измерение флуоресценции с указанным выше светофильтром. Интенсивность флуоресценции испытуемого образца сравнивается с интенсивностью флуоресценции стандартного раствора фолиевой кислоты. Основной раствор фолиевой кислоты го-

товится растворением 2 мг в 100 мл воды. Он хранится в желтой склянке под толуолом на холоду и перед определением из него готовится стандартный раствор путем разведения 1 мл до 10 мл с доведением рН раствора до 4,5 с помощью уксусной кислоты. В 1 мл стандартного раствора, таким образом, содержится 2 μ г фолиевой кислоты. Так как применяемые реактивы обычно обладают некоторой флуоресценцией, необходимо ставить холостой опыт, показания которого вычитаются из показаний опытного образца. Холостой опыт ставится по той же самой прописи, но без испытуемого объекта.

Расчет содержания фолиевой кислоты производится в микрограммах на 1 г испытуемого материала по следующей формуле:

$$X = \frac{(A - B) CE}{aD}$$

где A — показание гальванометра для испытуемого объекта; B — показание гальванометра для холостого опыта; C — объем в мл вытяжки, идущей на измерение флуоресценции; E — содержание фолиевой кислоты в стандартном растворе в μ г на 1 мл (обычно 2 μ г); a — навеска материал в г с учетом взятого на адсорбцию объема вытяжки; D — показание гальванометра для стандартного раствора.

В случае высокобелковых продуктов, таких как печень, дрожжи, оказалось, что фолиевая кислота полностью не экстрагируется указанным выше способом и необходимо дополнительное проведение ферментативной обработки. В то же время для зерновых продуктов, зеленых частей растений, овощей и фруктов ферментативная обработка оказалась излишней. При ферментативной обработке можно применять такадиастаз, полидазу или мицелий гриба пенициллиум, как это предложено К. Л. Поволоцкой и Е. П. Скоробогатовой (3). Эти препараты должны быть очищены от флуоресцирующих примесей путем отмывания 10% раствором сернистого аммония до исчезновения флуоресценции промывных вод.

Техника ферментативной обработки сводится к следующему. Полученная первоначальная кислотная вытяжка охлаждается до 40°, рН ее доводится до 4,7 с помощью 2,5 М раствора уксуснокислого натрия и к ней добавляется 100 мг ферментативного препарата. Вытяжка с добавленным ферментным препаратом ставится в термостат при 40—45° на ночь, после чего рН доводится до 3, а общий объем до 100 мл, вытяжка фильтруется и от нее берется 50—75 мл на дальнейшую обработку, которая ведется, как указано выше. При применении ферментативной обработки холостой опыт ведется с добавлением фермента. В табл. 1 приведены результаты определения чистой фолиевой кислоты по предлагаемому методу.

Таблица 1

Определение фолиевой кислоты в чистых растворах при разной концентрации (в μ г на 1 мл)

Исходное содержание	Возврат фолиевой кислоты	% возврата	Исход содержание	Возврат фолиевой кислоты	% возврата
1,0	1,1	110	10,0	9,3	93
2,0	2,05	102,5	20,0	21,0	105
3,0	3,2	106,6	50,0	39,0	78
5,0	4,9	98	100,0	70,0	70

Из табл. 1 видно, что при концентрации до 20 μ г на 1 мл возврат фолиевой кислоты почти количественный; при более высоких концентрациях наблюдается ее недоопределение.

Микробиологические определения (табл. 2) проводились с

культуры *Strept. faecalis* R. по методике, налаженной в нашей лаборатории О. И. Пушкинской.

Таблица 2

Сопоставление результатов определения
фолиевой кислоты химическим и микробио-
логическим методами (в $\mu\text{г}$ на 1 г)

Продукты	Данные хими- ческого метода	Данные микро- биологич. методов
Печень, бычья	15,7	14,4
Дрожжи пекарские	15,5	13,8
Пшеница зерно	8,0	6,0
Шпинат	5,8	4,2
Капуста белокочанная	2,9	2,1
Морковь	1,3	1,2
Томаты зрелые парниковые	0,63	0,5

Из табл. 2 видно, что расхождения между обоими методами сравнительно невелики, и это позволяет рекомендовать флуорометрический метод для предварительного суммарного определения веществ, относимых к фолиевой кислоте. Естественно, что по этому методу получаются несколько завышенные результаты, так как определяются все вещества, имеющие в своем строении пиразино-пиримидиновую структуру, но, повидимому, в естественных, не подвергнутых обработке продуктах преобладают микробиологически активные формы фолиевой кислоты.

Таблица 3

Содержание фолиевой кислоты в разных продуктах
(в $\mu\text{г}$ на 1 г)

Продукты	На 1 г све- жего материала		Продукты	На 1 г све- жего материала	
	На 1 г све- жего материала	На 1 г сухо- го вещества		На 1 г све- жего материала	На 1 г сухо- го вещества
Печень бычья	15,7	45,8	Капуста белокочанная	2,9	37,0
» кита	46,8	136,5	» цветная	3,96	41,2
Дрожжи пекарские	15,5	69,1	Морковь корень	1,3	6,9
Пшеница зерно	8,0	8,8	» ботва	4,35	34,8
Овес зерно	1,4	1,54	Свекла корень	2,4	18,4
» проростки	5,94	58,8	» ботва	3,66	38,5
Шпинат	5,8	77,3	Томаты зеленые	1,12	18,6
Салат	1,5	20,2	» зрелые	1,69	29,5
Крапива глухая	4,75	38,0	Картофель	2,6	11,9
» жгучая	5,84	44,9	Яблоко Антоновка	3,17	24,8
Петрушка зелень	2,8	13,7	Виноград	3,26	23,0
Сельдерей »	3,0	13,8	Арбуз	0,9	19,5
			Дыня	1,58	32,2

Из табл. 3 видно, что наибольшим содержанием фолиевой кислоты, как и по другим витаминам группы В, обладают печень и дрожжи, но в отличие от этих витаминов, значительные количества фолиевой кислоты накапливаются в овощах и плодовых культурах, в особенности в листовых органах. Более детальное выяснение распределения и условий биосинтеза фолиевой кислоты в растительных тканях должно помочь пониманию ее роли в обмене веществ растения.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
2 XI 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ B. L. Hutchings, E. L. Stokstand et al, J. Biol. Chem., 168, 705 (1947).
² R. J. Williams, H. K. Mitchell and E. H. Frieden, J. Am. Chem. Soc., 66, 269 (1944). ³ К. Л. Поволоцкая и Е. П. Скоробогатова. Биохимия, 12, 268 (1947).