

在线微管反应器光催化氧化衍生-荧光光度法测定叶酸

张凯龙, 郭雨微, 陈锦仪, 高俊, 谭志文, 汪财生
(浙江万里学院 生物与环境学院 浙江宁波 315100)

摘要 叶酸是重要的食物来源维生素。为提高叶酸测定效率,本文建立了一种基于微管反应器的在线光催化氧化衍生联合荧光光度法测定叶酸的系统和方法,优化运行参数,考察评价方法并应用于实际样品测定。结果表明,小孔径石英螺旋管微反应器成功腐蚀涂覆纳米二氧化钛催化剂,紫外光照射流动叶酸样品实现在线光催化氧化衍生,最佳衍生条件 pH 4.2、流速 250 $\mu\text{L}/\text{min}$,荧光最大激发波长和发射波长位于 280 nm 和 442 nm,叶酸在质量浓度 0.1~2.0 mg/L 范围与荧光强度呈线性相关,标准曲线方程 $F=381.68c+10.53$,相关系数达到 0.998,检出限($3s/k$)为 7.2 $\mu\text{g}/\text{L}$,运行稳定性相对平均偏差为 0.9%~2.4%,对多种常见物质具有抗干扰能力。应用本法测定叶酸片剂含量误差在 5%以内,加标回收率在 94.7%~102.1%范围,相对平均偏差不超过 2.1%。

关键词 叶酸; 荧光光度法; 光催化; 纳米二氧化钛; 在线分析

文章编号 1009-7848(2025)02-0433-08 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2025.02.038

叶酸是一种重要的水溶性 B 族维生素,也称作蝶酰谷氨酸,是由蝶呤、对氨基苯甲酸和多个谷氨酸组成。叶酸虽在人体生理代谢和疾病预防过程中具有重要作用^[1-4],但人体无法自主合成叶酸,只能从食品中摄取。叶酸稳定性较差,在光、热条件下容易分解。叶酸含量测定在食品分析、营养保健、卫生健康等诸多领域应用极为广泛,因此,建立快速、高效、准确的叶酸测定方法极为必要。

目前叶酸测定方法有紫外分光光度法^[5]、荧光法^[6-9]、液相色谱法^[10-12]、电化学方法等^[13-16]。荧光分析仪器配置广、样品需求量小、线性范围宽、检出限低、灵敏度高,是叶酸测定的理想方法。叶酸本身并无荧光活性,而叶酸氧化产物 6-甲酰基蝶呤(6-FOP)具有强荧光发射性能,这为叶酸氧化衍生荧光法测定奠定了基础。叶酸氧化方法有过氧化氢^[17]、芬顿(Fenton)试剂^[18]、超声等^[19]。光催化氧

化技术以光生活性氧化基团为氧化剂,已广泛应用于环境污染治理等多个领域^[20-22]。利用负载光催化剂,有望为叶酸测定提供绿色清洁、免试剂、无接触光催化氧化衍生新方法。

在线分析将传统仪器分析中离散的样品预处理、进样、测量等诸多步骤进行有机整合,实现了从样品到结果“一站式”分析。基于微反应器的在线分析样品需求量小,试剂消耗低,分析响应迅速,过程控制简单,获得广泛关注^[23-25]。微针、微流控芯片等微反应器制作需要专业设备,成本高,环节多,在一定程度上限制了微反应器在线分析的发展和应

用。本文基于可抛弃式低成本小孔径螺旋微管反应器,利用低功耗紫外光驱动纳米二氧化钛光催化氧化反应,建立一种在线光催化氧化衍生联合荧光光度法测定叶酸的装置系统和方法,以实现在线快速、高效测定叶酸。

1 材料与方

1.1 试剂与材料

叶酸(分析标准品, $\geq 98\%$),上海阿拉丁生化试剂有限公司;钛酸四丁酯、硝酸、氨水、甲酸、乙酸、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、邻苯二甲酸氢钾,均为分析纯级,国药集团化学试剂有限公司;叶酸片剂(0.4 mg/片),江苏联环药业股份有限公司;梨子、苹果和卷心菜为市售;自制超纯水。

收稿日期: 2024-02-27

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGC21B070003); 浙江省“生物工程”一流学科科研项目(ZS2021010);“食品质量与安全”浙江省一流专业建设项目(教高厅函〔2022〕14号);国家级大学生创新创业训练计划项目(202310876017)

第一作者: 张凯龙,男,硕士,高级实验师
E-mail: chemnb@163.com

1.2 仪器与设备

Ultima IV 型 X 射线粉末衍射仪, 日本 Rigaku; Sigma 300 扫描电子显微镜, 德国 ZEISS; Nicolet iS20 傅里叶变换红外光谱仪, 美国 ThermoFisher Scientific; F-4600 荧光分光光度计, 日本日立公司; 荧光流动比色皿(容积 100 μL , 光程 1 cm), 江苏析谱光学仪器有限公司; 紫外灯(3 W, 主波长 254 nm), 广东雪莱特光电科技股份有限公司; TJP-3A 注射泵, 保定兰格恒流泵有限公司; TLE104E 分析天平, 梅特勒-托利多上海有限公司; FE-28 pH 计, 梅特勒-托利多国际有限公司; SU-761 超声波清洗剂, 佛山市活力源电子科技有限公司; SX2-2.5-10TP 马弗炉, 上海一恒科学仪器有限公司。

小孔径螺旋石英管(1.0 mm \times 2.0 mm, 螺旋直径 2 cm, 14 匝), 东海县晟亿石英制品有限公司; 聚四氟乙烯 FEP 管(1.0 mm \times 2.0 mm), 南京润泽流体控制设备有限公司; 硅胶管(1.6 mm \times 3.2 mm), 南京润泽流体控制设备有限公司; 两通接头(1.5 mm), 卡默尔流体科技(上海)有限公司; 注射器(10 mL), 镇江康利医疗器械有限公司。

1.3 方法

1.3.1 储备液及缓冲液配制

1.3.1.1 叶酸储备液 准确称取 10.0 mg 叶酸溶于一定量稀氨水溶液中, 在棕色容量瓶中用去离子水定容至 100 mL, 获得 100 mg/L 叶酸溶液, 使用时梯度稀释至需要质量浓度。

1.3.1.2 pH 值缓冲溶液 分别称量适量氢氧化钠(NaOH)-甲酸(HCOOH), 氢氧化钠(NaOH)-乙酸(CH₃COOH), 磷酸二氢钠(NaH₂PO₄)-磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)溶解稀释配制, 用 pH 计标定准确值。

1.3.2 光催化剂负载及表征 螺旋石英管预先用 0.5 mol/L 的 Na₂CO₃ 溶液清洗除油, 两端接入硅胶管浸入 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴保温, 蠕动泵循环通入 4 mol/L 的 NH₄HF₂ 溶液腐蚀 12 h 后, 继续用去离子水洗涤至中性后干燥。

以硝酸为抑制剂, 钛酸四丁酯为钛源水解制备流动性溶胶, 注射溶胶通过螺旋石英管进行涂覆, 通入空气排出多余凝胶, 将螺旋石英管恒温静置过夜使涂覆溶胶凝胶化, 干燥后将螺旋石英管

整体移入马弗炉, 500 $^{\circ}\text{C}$ 热处理 2 h 后自然冷却。

负载催化剂二氧化钛物相组成采用 X 射线粉末衍射仪测定, 2θ 范围 $5^{\circ}\sim 90^{\circ}$; 微观形貌通过扫描电子显微镜观测; 表面官能团使用傅里叶变换红外光谱仪扫描, 波数范围 400~4 000 cm^{-1} 。

1.3.3 在线衍生-测定系统 在线光催化氧化衍生-荧光测量系统及衍生核心组件螺旋石英管微反应器如图 1、2 所示, 系统包含进样、衍生和测量 3 部分, 各部分间通过 FEP 管道连接。待测样品注射器固定于微量注射泵, 出口连接至螺旋石英管入口, 螺旋石英管内腔放置小型柱状紫外灯, 出口连接至流动荧光比色皿进样端, 尾端连接至废液收集。

衍生部分螺旋石英管微反应器和内腔紫外灯置于风冷避光方形散热器中, 阻隔紫外光泄露和伤害。

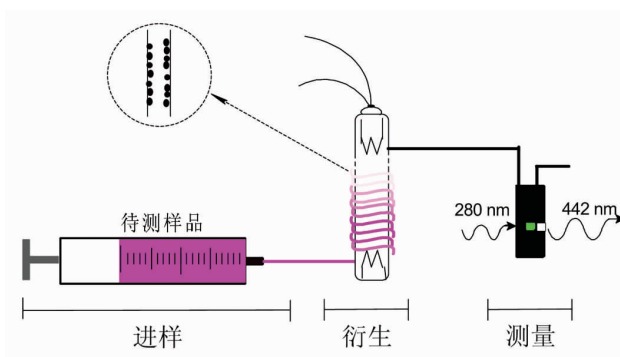


图 1 在线光催化氧化衍生-荧光法测定叶酸系统

Fig.1 System for determination of folic acid by online photocatalytic oxidation derivatization-fluorescence method

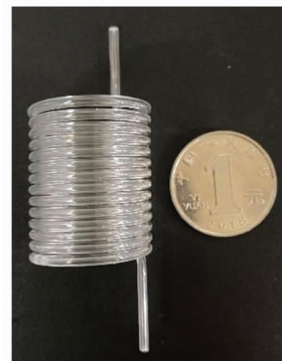


图 2 螺旋石英管微反应器

Fig.2 Spiral quartz tube microreactor

1.3.4 在线衍生-测定方法 紫外灯和荧光分光光度计提前预热。待测样品用 pH 值为 4.2 的 HAc-NaAc 缓冲溶液配制装载到进样注射器, 荧光分光光度计设置为荧光时间模式, 激发波长 280 nm, 发射波长 442 nm, 设置采样频率和时长。测定时注射泵设置流速, 开启注射进样流通系统管路, 待溶液稳定流出荧光比色皿时开始采集荧光强度数据。荧光强度时间序列取平均值, 根据荧光强度-叶酸质量浓度标准曲线外标法定量。

2 结果与分析

2.1 在线光催化氧化衍生-荧光光度法测定叶酸原理

由于分子内“自淬灭”叶酸本身无荧光活性, 叶酸分子在氧化反应过程中 6-甲基蝶呤与对氨基苯甲酸片段之间的-C-N-键断裂, 有效阻止分子内光诱导电子转移, 使生成的 6-FOP 平面共轭程度提高显示出强荧光发射^[9, 26]。

纳米二氧化钛是一种广泛使用的金属氧化物半导体光催化剂, 具有良好的稳定性、生物兼容性和安全性, 当受到合适波长 (≤ 410 nm) 光线照射时发生电子跃迁, 产生空穴 (h^+ , +2.5 V vs. SHE) 及次生羟自由基 ($\cdot OH$, +2.3 V vs. SHE)、超氧自由基 ($\cdot O_2^-$, -0.3 V vs. SHE) 等活性氧化基团^[27], 如图 3 所示, 叶酸在螺旋石英微反应器内连续流动过程中持续受这些“氧化剂”进攻, 实现了免试剂、无接触、可控叶酸氧化衍生, 定量生成荧光活性物质 6-FOP, 从而实现了荧光光度法叶酸间接测定。

2.2 光催化剂二氧化钛表征

纳米二氧化钛 XRD 谱如图 4 所示, 在衍射角 2θ 为 27.44° , 36.08° , 41.24° , 54.32° , 56.63° , 69.01° 等处呈现出强衍射峰, 经检索归属于金红石相二氧化钛 (JCPDS No.21-1276) 的特征峰, 分别对应于 (110)、(101)、(111)、(211)、(220)、(301) 等晶面, 无其它杂质峰, 衍射峰强度高而窄具有较高的结晶度。尽管活性略低于锐钛矿相, 金红石相二氧化钛依然具有较强光催化活性, 并表现出更好地稳定性和宽波长响应活性 (≤ 410 nm)^[20, 27-28], 为叶酸氧化衍生提供了优良光催化剂。

负载纳米二氧化钛微观形貌如图 5 所示, 二

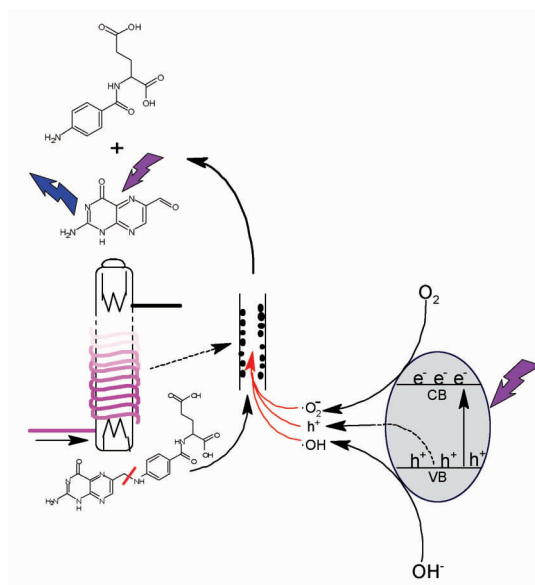


图 3 叶酸光催化氧化衍生机理

Fig.3 Derivative mechanism of folic acid photocatalytic oxidation

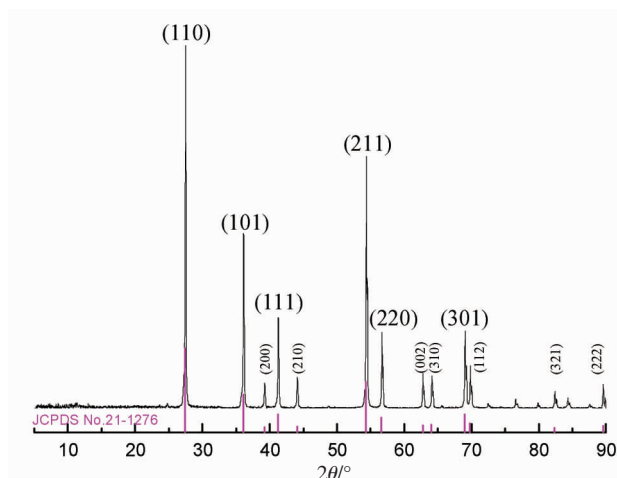


图 4 纳米二氧化钛 XRD 谱

Fig.4 XRD pattern of nano-TiO₂

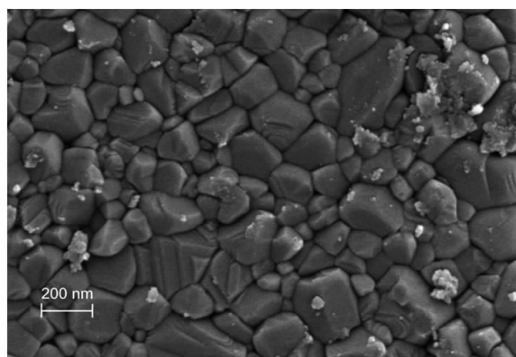


图 5 纳米二氧化钛 SEM 图

Fig.5 SEM image of nano-TiO₂

氧化钛颗粒呈近八面体不规则体型结构,这可能是由于溶胶化二氧化钛晶化发育不完全所致,催化剂颗粒在平面上致密排列,粒径主体分布在100 nm左右,小尺寸粒径和晶体缺陷有助于提升光催化活性。

纳米二氧化钛红外光谱如图6所示,526 cm^{-1} 处的吸收峰是由 $[\text{TiO}_6]$ 八面体配位振动吸收所致,1382 cm^{-1} 处的吸收峰归属于表面吸附或残留溶剂有机分子的C-H键弯曲振动,3430 cm^{-1} 宽带吸收和1630 cm^{-1} 处吸收归属于表面水分子和羟基O-H的伸缩振动和弯曲振动。

2.3 激发和发射光谱

以1 mg/L叶酸溶液进样,不同条件下扫描激发和发射光谱如图7所示,叶酸溶液本身几乎无荧光发射,无涂覆纳米二氧化钛时单独紫外光照射溶液表现出较弱激发和发射峰,由于紫外光能量较高与部分共价键键能相当,紫外光照导致叶酸分子结构特定共价键断裂生成荧光活性物质,因而紫外光对叶酸表现出一定的氧化衍生作用。紫外光催化纳米二氧化钛氧化条件下,衍生液显示出强烈荧光激发和发射,最大激发和发射波长位于280 nm和442 nm附近,并且442 nm处荧光发射强度达到单独紫外光照射时的6倍,显然这主要来源与紫外光催化纳米二氧化钛产生的大量高活性氧化基团氧化衍生,同时,纳米二氧化钛大比表面积为光催化氧化提供了丰富活性位点,小内径螺旋石英微管加速了氧化反应物质传质扩散,从动力学角度促进了氧化衍生反应,使得荧光强度得到有效增加,满足高灵敏度测定需求。

2.4 衍生条件优化

2.4.1 pH值 为考察pH值对衍生反应的影响,使用不同缓冲溶液配制叶酸溶液进样测定,结果如图8所示,衍生液荧光强度随pH值变大呈先增加后降低趋势,在pH值为4.2的HAc-NaAc缓冲体系中荧光强度达到最大值,是叶酸样品溶液制备最佳介质,pH值对荧光强度的作用可能是由于会影响二氧化钛表面电子-空穴次生活性氧化物生成,同时也会影响叶酸及其氧化产物6-FOP在溶液中存在形态和荧光发射性能两方面所贡献。

2.4.2 样品流速 叶酸溶液不同进样流速时荧光发射强度如图9所示,进样流速在250 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时

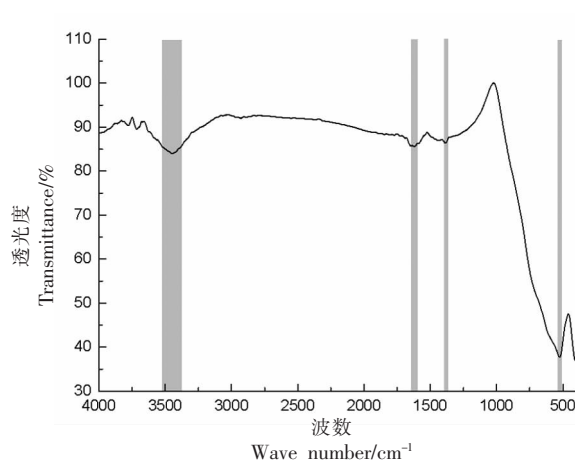
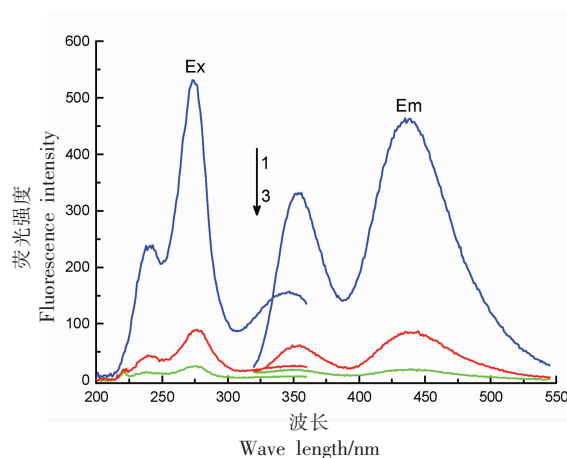


图6 纳米二氧化钛红外光谱

Fig.6 FT-IR spectra of nano-TiO₂



注:1. FA+UV+TiO₂;2. FA+UV;3. FA;Ex. 激发光谱;Em. 发射光谱。

图7 不同衍生条件下叶酸激发和发射光谱

Fig.7 Excitation and emission spectra of folic acid under different derivatization conditions

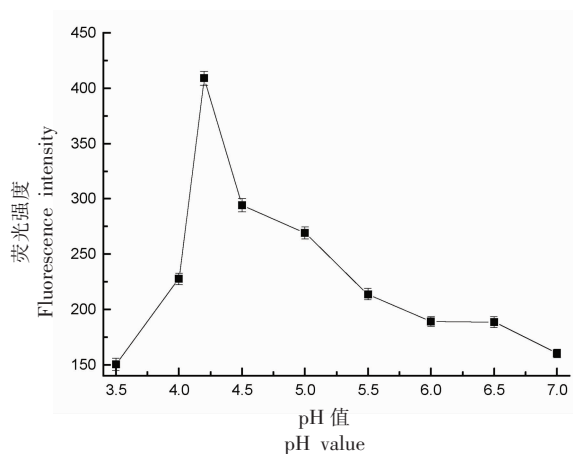


图8 pH值对荧光强度的影响

Fig.8 Effects of pH value on fluorescence intensity

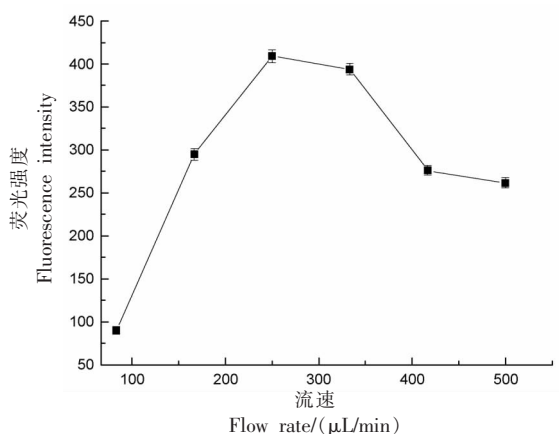


图 9 叶酸流速对荧光强度的影响

Fig.9 Effects of folic acid flow rate on fluorescence intensity

荧光强度最大, 而流速降低或升高时荧光强度都呈现出一定程度减小, 由于光催化氧化无选择性, 流速较低时会对生成的荧光活性物质 6-FOP 进一步降解, 从而降低了荧光强度, 而高流速时则可能氧化衍生不足, 同时叠加对荧光活性物质 6-FOP 稀释导致荧光强度减弱, 因此最佳注射进样速率为 250 μL/min。

2.5 测定范围及检出限

在优化条件下, 稀释配制系列梯度叶酸标准溶液测定荧光强度, 叶酸质量浓度与荧光强度拟合标准曲线如图 10 所示, 叶酸质量浓度在 0.10~2.00 mg/L 范围内与荧光强度线性相关, 拟合标准曲线方程 $F=381.68c+10.53$, F 为荧光强度, c 为叶酸质量浓度 (mg/L), 相关系数 R^2 达到 0.998。以叶酸空白进样, 通过 3 倍信噪比计算检出限 ($3s/k$) 为 7.2 μg/L, 10 倍信噪比 ($10s/k$) 计算定量限为 24.0 μg/L。

2.6 稳定性

由于注射泵注射波动、液流混合和荧光分光光度计噪音, 采集荧光强度时间序列存在一定的波动, 以质量浓度为 0.40, 0.80, 1.00, 1.40, 1.60 mg/L 的叶酸样品进样测定, 计算相对平均偏差为 2.4%, 1.8%, 1.6%, 1.4%, 0.9% ($n=300$), 其中 1.00 mg/L 叶酸时间序列如图 11 所示, 相对平均偏差均小于 5%, 表明系统具有良好的稳定性, 采样频率 1 Hz, 采样时长 1 min 时, 单次分析样品溶液需求小于 4 mL, 用时小于 5 min。

2.7 抗干扰性

为考察方法的抗干扰性, 在 1.00 mg/L 叶酸中

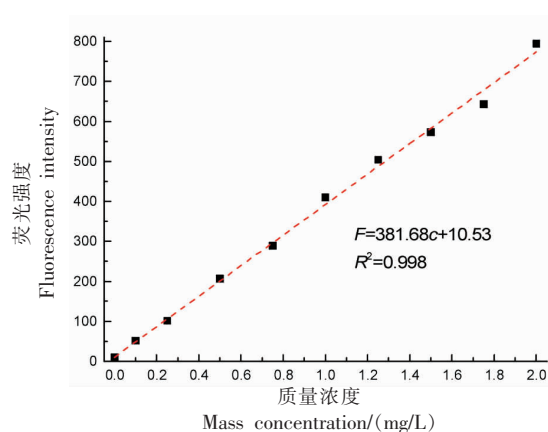


图 10 叶酸质量浓度-荧光强度标准曲线

Fig.10 Standard curve of folic acid mass concentration and fluorescence intensity

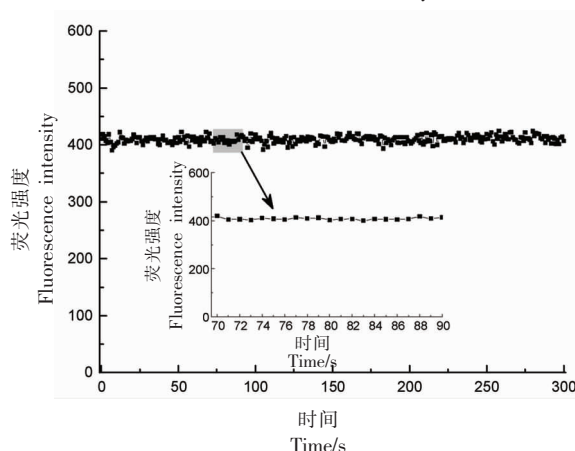


图 11 在线衍生-测量系统运行稳定性

Fig.11 Operation stability of on-line derivative-measurement system

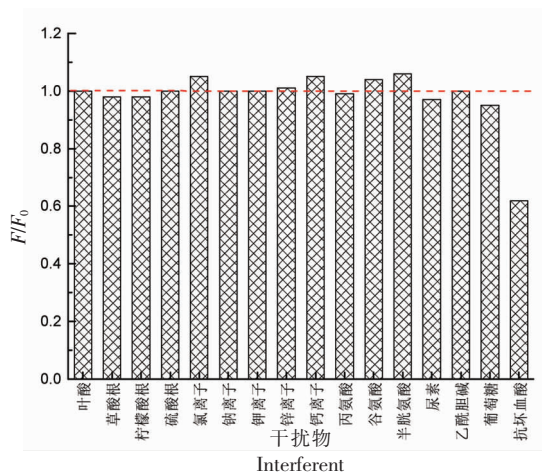


图 12 常见物质对叶酸荧光的干扰

Fig.12 Anti-interference of common substances on fluorescence intensity

加入不同种类不同质量浓度的干扰物,测定其对荧光强度的影响,结果如图12所示,在 $\pm 10\%$ 误差范围内,100倍质量浓度的丙氨酸、谷氨酸、尿素、草酸、柠檬酸、硫酸根和氯阴离子,钾、钠、锌、钙阳离子,10倍质量浓度的乙酰胆碱、半胱氨酸、葡萄糖均无影响,方法具有较好的抗干扰能力。10倍质量浓度抗坏血酸会抑制荧光强度,这可能与抗坏血酸还原性有关,使得光催化产生的空穴、羟自由基、过氧自由基等氧化性基团浓度降低,降低了叶酸氧化衍生程度所致。

2.8 样品测定及回收率

市售梨子、苹果和卷心菜叶酸测定,按文献方法提取叶酸^[18],测定叶酸含量为3.40,1.80,3.10 mg/kg。

叶酸片剂测定,片剂一粒研磨成粉末,加入30 mL体积分数为0.5%的氨水超声30 min,转移到100 mL棕色容量瓶,用去离子水洗涤定容,0.45 μm 滤头过滤收集滤液,此时标识浓度为4.0 mg/L,继续用pH值为4.2的缓冲溶液稀释10倍后进样测定荧光强度,依据标准曲线计算叶酸含量为0.42 mg/L,测定含量误差小于5%。

以叶酸片稀释液为背景,进行加标回收率测试,结果如表1所示,加标回收率在94.7%~102.1%之间,相对平均偏差(RSD)在1.3%~2.1%之间,表明方法具有良好的精密度和重现性,可以用于实际样品中叶酸含量测定。

表1 叶酸含量及加标回收率($n=300$)

Table 1 Folic acid content and recovery rate ($n=300$)

叶酸含量/ (mg/L)	加标量/ (mg/L)	测定值/ (mg/L)	加标回收 率/%	RSD/%
	0.10	0.52	100.0	2.1
0.42	0.48	0.92	102.1	1.3
	0.94	1.31	94.7	2.0

3 结论

本研究开发构建了一种基于微管反应器的在线光催化氧化衍生串联荧光光度法叶酸测定的系统和方法,实现了叶酸测定从进样到结果在线直达。叶酸经光催化氧化衍生显示强荧光发射,叶酸质量浓度在0.1~2.0 mg/L范围内与荧光强度线性相关,检出限($3s/k$)为7.2 $\mu\text{g/L}$,单次分析样品需

求小于4 mL,用时小于5 min。系统简单紧凑易构建,光催化氧化衍生免试剂无接触绿色清洁,荧光法高效灵敏,具有良好稳定性和抗干扰性,为食品、药品生产及营养健康等领域叶酸快速准确测定需求提供了新手段和思路。

参 考 文 献

- [1] TARUSCIO D, CARBONE P, GRANATA O, et al. Folic acid and primary prevention of birth defects[J]. *Biofactors*, 2011, 37(4): 280-284.
- [2] SHEN Q R, HE Q, PAN Y J, et al. Detection, isolation, and characterization of a novel impurity from several folic acid products[J]. *Journal of Zhejiang University -SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 2022, 23(7): 597-606.
- [3] CIESLIK E, CIESLIK I. Occurrence and significance of folic acid[J]. *Pteridines*, 2018, 29(1): 187-195.
- [4] BJELAKOVIC G, STOJANOVIC I, STOIMENOV T J, et al. Polyamines, folic acid supplementation and cancerogenesis[J]. *Pteridines*, 2017, 28(3/4): 115-131.
- [5] MATIAS R, RIBEIRO P R S, SARRAGUÇA M C, et al. A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests[J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(9): 3065-3071.
- [6] PENG Y G, DONG W F, WAN L, et al. Determination of folic acid via its quenching effect on the fluorescence of MoS₂ quantum dots[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186(9): 605.
- [7] 邓小燕, 李佳渝, 谭克俊. 基于碳量子点荧光分光光度法检测叶酸[J]. *分析化学*, 2014, 42(4): 542-546.
DENG X Y, LI J Y, TAN K J. Carbon quantum dots-based fluorescence spectrophotometric assay of folic acid[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(4): 542-546.
- [8] LI X G, WU X M, ZHANG F, et al. Label-free detection of folic acid using a sensitive fluorescent probe based on ovalbumin stabilized copper nanoclusters[J]. *Talanta*, 2019, 195: 372-380.
- [9] 吴姝, 陈思, 胡琪, 等. 光催化氧化荧光衍生法检测叶酸[J]. *分析科学学报*, 2022, 38(1): 1-5.
WU S, CHEN S, HU Q, et al. Determination of

- folic acid based on photo-catalytic oxidation fluorescence derivatization[J]. *Journal of Analytical Science*, 2022, 38(1): 1-5.
- [10] BREITHAUPT D E. Determination of folic acid by ion-pair RP-HPLC in vitamin-fortified fruit juices after solid-phase extraction [J]. *Food Chemistry*, 2001, 74(4): 521-525.
- [11] 倪兴刚, 邓泽元, 李静, 等. 手性色谱法测定 L-5-甲基四氢叶酸钙含量[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(9): 270-275.
- NI X G, DENG Z Y, LI J, et al. Determination of calcium L-5-methyltetrahydrofolate by chiral chromatography[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(9): 270-275.
- [12] BERTUZZI T, RASTELLI S, MULAZZI A, et al. LC-MS/MS determination of mono-glutamate folates and folic acid in beer[J]. *Food Analytical Methods*, 2019, 12(3): 722-728.
- [13] KUCEKI M, DE OLIVEIRA F M, SEGATELLI M G, et al. Selective and sensitive voltammetric determination of folic acid using graphite/restricted access molecularly imprinted poly (methacrylic acid)/SiO₂ composite[J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2018, 818: 223-230.
- [14] MOVAGHGHARNEZHAD S, MIRABI A. Advanced nanostructure amplified strategy for voltammetric determination of folic acid[J]. *International Journal of Electrochemical Science*, 2019, 14(12): 10956-10965.
- [15] GARCIA S M, WONG A, KHAN S, et al. A simple, sensitive and efficient electrochemical platform based on carbon paste electrode modified with Fe₃O₄@MIP and graphene oxide for folic acid determination in different matrices [J]. *Talanta*, 2021, 229: 122258.
- [16] 王博伦, 顾丰颖, 刘子毅, 等. 食品中叶酸测定方法的研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(9): 294-300.
- WANG B L, GU F Y, LIU Z Y, et al. Advances in methods for the determination of folate in foods [J]. *Food Science*, 2020, 41(9): 294-300.
- [17] WANG Y, ZHU P H, TIAN T, et al. Synchronous fluorescence as a rapid method for the simultaneous determination of folic acid and riboflavin in nutritional beverages[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(23): 12629-12634.
- [18] 苏文斌. Fenton 试剂氧化-荧光分析法测定果蔬中叶酸的含量[J]. *食品科学*, 2011, 32(4): 212-215.
- SU W B. Fluorimetric determination of folic acid in vegetable samples using fenton reagent as oxidant[J]. *Food Science*, 2011, 32(4): 212-215.
- [19] LUO D, WANG J. A sono-oxidation fluorescence method and determination of folic acid in pharmaceutical formulation [J]. *Oxidation Communications*, 2011, 34(3): 675-683.
- [20] LI Y, LIN X R, LI Z P, et al. Highly-efficient and visible light photocatalytic degradation of organic pollutants using TiO₂-loaded on low-cost biomass husk[J]. *Materials*, 2022, 15(23): 8671.
- [21] LI X H, GUO S H, KAN C X, et al. Au multi-mer@MoS₂ hybrid structures for efficient photocatalytic hydrogen production via strongly plasmonic coupling effect[J]. *Nano Energy*, 2016, 30: 549-558.
- [22] 祝贝贝, 吴佳, 魏璇, 等. 基于光催化的 TiO₂-大豆分离蛋白包装膜的制备与表征[J]. *中国食品学报*, 2013, 13(3): 35-41.
- ZHU B B, WU J, WEI X, et al. Preparation and characterization of TiO₂/SPI blend film[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(3): 35-41.
- [23] KRISHNAKUMAR A, MISHRA R K, KADIAN S, et al. Printed graphene-based electrochemical sensor with integrated paper microfluidics for rapid lidocaine detection in blood[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1229: 340332.
- [24] SHENG J, ZHANG L, LEI J P, et al. Fabrication of tunable microreactor with enzyme modified magnetic nanoparticles for microfluidic electrochemical detection of glucose [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 709: 41-46.
- [25] 朱晓婷, 朱哲欣, 叶美英. 微反应器中有机磷水样的光催化降解及总磷在线检测[J]. *分析化学*, 2019, 47(1): 106-111.
- ZHU X T, ZHU Z X, YE M Y. Photocatalytic degradation of organic phosphorus in microreactor and on-line detection of total phosphorus[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2019, 47(1): 106-111.
- [26] BAILEY S W, AYLING J E. Differential coulometric oxidation following post column-switching high pressure liquid chromatography for fluorescence measurement of unmetabolized folic acid in human plasma

- [J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1315: 86–91.
- [27] SCHNEIDER J, MATSUOKA M, TAKEUCHI M, et al. Understanding TiO₂ photocatalysis: Mechanisms and materials [J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114 (19): 9919–9986.
- [28] 张青红, 高濂, 郭景坤. 二氧化钛纳米晶的光催化活性研究[J]. *无机材料学报*, 2000, 15(3): 556–560.
- ZHANG Q H, GAO L, GUO J K. Photocatalytic activity of nanosized TiO₂[J]. *Journal of Inorganic Materials*, 2000, 15(3): 556–560.

Online Photochemical Oxidation Derivatization Combined with Fluorescence Spectrometry for the Determination of Folic Acid Based on Microtubule Reactor

ZHANG Kailong, GUO Yuwei, CHEN Jinyi, GAO Jun, TAN Zhiwen, WANG Caisheng

(College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang)

Abstract Folic acid is an important food source vitamin. In order to improve the efficiency of folic acid determination, a system and method for the determination of folic acid by on-line photocatalytic oxidation derivatization combined with fluorescence spectrophotometry based on microtubular reactor was developed. System operating parameters were optimized, and the method was investigated and evaluated, then applied to the determination of actual samples. The results showed that nano-titanium dioxide catalyst was successfully corroded and coated in spiral tube quartz microreactor with small inner diameter, and folic acid on-line derivatization was realized by photocatalytic oxidation with ultraviolet light irradiation. The optimal derivatization pH was 4.2, flow rate was 250 $\mu\text{L}/\text{min}$, the maximum excitation and emission wave length were 280 nm and 442 nm. Under the optimal conditions. There was a good linear relationship between fluorescence intensity and folic acid concentration in the range of 0.1–2.0 mg/L. The standard curve equation was $F=381.68c+10.53$, the correlation coefficient and detection limit ($3s/k$) was 0.998 and 7.2 $\mu\text{g}/\text{L}$, respectively. The relative average deviation of operation stability was 0.9%–2.4%, meanwhile, it has excellent anti-interference ability to a variety of common substances. When the method was applied to folic acid tablets, it exhibited a relative error was less than 5%, the recovery rate was between 94.7% to 102.1%, and the relative average deviation was less than 2.1%.

Keywords folic acid; fluorescence spectrophotometry; photocatalysis; nano-titanium dioxide; on-line analysis