Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 17:58 +0330 on Saturday September 23rd 2017

مقاله پژوهشی

ارائه روش معتبرسازی اندازه‌گیری اسیدفولیک در آرد و نان غنی‌شده به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با به‌کارگیری دتکتور فلورسانس

امیر حیدری[1]، محمدرضا وردست[2]، سامال یگانه زارع[3]

تاریخ دریافت ۱۳۹۳/۰۸/۰۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۳/۱۰/۲۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: عمل غنی‌سازی آرد به‌عنوان مناسب‌ترین حامل جهت جبران کمبود آهن و اسیدفولیک در جیره غذائی، در سال‌های اخیر موردتوجه مسئولین بهداشت قرار گرفته است و از آنجائی که موضوع کنترل کیفی و کمی مواد غذایی از مباحث مهم در ارتباط با سبد غذایی افراد در هر جامعه محسوب می‌شود لذا در این خصوص لازم است تا انواع مواد موجود در مواد غذایی ازجمله اسیدفولیک مورد آنالیز واقع گردد. روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری اسیدفولیک در مقالات علمی ارائه گردیده است، ولی عملاً روش دقیق، آسان و مورداطمینانی تابه‌حال در ایران گزارش نشده است که در این تحقیق با توجه به مطالعات انجام‌یافته و بررسی مقالات متعدد در این زمینه، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با استفاده از دتکتور فلورسانس به دلیل حساسیت بالا برای آنالیز میزان اسیدفولیک در نمونه‌های آرد و نان غنی‌شده طراحی گردید.

مواد و روش‌ها: از آنجائی که اسیدفولیک خاصیت فلورسانس نداشته ما در این پروژه سعی نمودیم ساختمان شیمیائی این ویتامین را به کمک پرمنگنات به فرم فلئوروفور تبدیل نمائی‌ام. در این روش، پس از رسم منحنی کالیبراسیون استاندارد و استخراج اسیدفولیک از نمونه آرد و نان، میزان آن توسط دستگاه HPLC موردانداز‌ه‌گیری قرار می‌گیرد. جهت تشخیص و اندازه‌گیری مقادیر اسیدفولیک از دتکتور فلورسانس با طول‌موج تحریکی ۲۹۶ نانومتر و طول‌موج نشری ۴۴۰ نانومتر استفاده گردید. زمان بازداری برای اسیدفولیک ۱/۰۷ دقیقه به دست آمد. به‌عنوان فاز متحرک مخلوطی از متانول و آب دیونیزه به نسبت ۲۰ به ۸۰ استفاده شد. سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم گردید. سیستیم HPLC شامل یک پمپ گرادیانت، ستون از نوع C18 به طول ۱۰ سانتیمتر و قطر ۴/۶ میلی‌متر بود.

یافته‌ها: منحنی کالیبراسیون در فاصله غلظتی ۸-۰/۱ میکروگرم بر لیتر در محدوده خطی قرار دارد و در این روش حد تشخیص ۰/۰۳ میکروگرم بر لیتر حاصل گردید. منحنی جذب اسیدفولیک در زمان ۱/۱۲ دقیقه ظاهر گردید. نتایج آنالیزها نشان دادند که ضریب تغییرات درون روزی برای ۳ غلظت ذکرشده، بین ۲/۳۷ – ۰/۰۷ میکروگرم بر لیتر ۵ قرار داشت. برای تغییرات بین روزی نیز ۳ غلظت مختلف ذکرشده موردبررسی قرار گرفتند. نتایج آنالیز آن‌ها نیز نشان داد که ضریب تغییرات بین روزی بین ۷/۸۲ –۳/۰۹ میکروگرم بر لیتر قرار داشت. این آزمایش‌ها سه بار بر روی هر نمونه انجام شد. بررسی نتایج نشان‌دهنده استخراج حدود ۷۲درصد در نمونه‌های آرد و نان هست. مقدار اسیدفولیک در آردها و نان‌ها به ترتیب ۱۰۲ و ۸۵ میکروگرم بر ۱۰۰ گرم را نشان می‌دهد که گویای کاهش ۱۶/۶۷ درصدی از مقدار اسیدفولیک در طی پروسه تهیه نان می‌باشد.

نتیجه‌گیری: روش ما نشان داد که می‌تواند به‌عنوان یک روش آنالیز برای کنترل و اندازه‌گیری مقدار اسیدفولیک در آردهای غنی‌شده در آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو به‌عنوان یک روش ساده و دقیق برای تعیین مقدار اسیدفولیک مورداستفاده قرار گیرد. نتایج حاصل از آنالیزها در خصوص میزان تکرارپذیری، صحت و دقت روش، میزان درصد بازیافت و حد تشخیص روش، همگی بیانگر اعتبار علمی و عملی این روش آنالیز می‌باشند و نیز همخوانی نتایج به‌دست‌آمده با نتایج سایر منابع علمی تائید کننده این مسئله می‌باشد.

کلمات کلیدی: اسیدفولیک، غنی‌سازی، HPLC، دتکتور فلورسانس

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره دوازدهم، ص۱۱۱۱-۱۱۰۲، اسفند ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده داروسازی، تلفن: تلفن ۲۷۵۴۹۹۱-۰۴۴۱

Email: Heydari.866@Gmail.com

[1] استادیار گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلامت مواد غذائی و آشامیدنی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

[2] استادیار گروه شیمی داروئی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

[3] مرکز تحقیقات سلامت مواد غذائی و آشامیدنی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 17:58 +0330 on Saturday September 23rd 2017

مقدمه

فقر آهن و اسیدفولیک یکی از شایع‌ترین اختلالات تغذیه‌ای در کشورهای درحال‌توسعه و مهم‌ترین نوع کم‌خونی در زنان در سنین باروری و کودکان است که با ایجاد گلبول‌های قرمز کوچک و کاهش میزان هموگلوبین مشخص می‌گردد. این بیماری سبب اتلاف منابع و مراقبت‌های بهداشتی، کاهش بهره‌وری در اثر افزایش مرگ‌ومیر، ابتلا به بیماری در مادران و کودکان و بالاخره کاهش ظرفیت جسمی و روانی در بخش بزرگی از جامعه می‌شود. علاوه بر آهن، اسیدفولیک نیز در ارتقاء سطح سلامتی جامعه حائز اهمیت بوده و با توجه به نقش ویژه اسیدفولیک در کاهش هموسیستئن از این ویتامین به‌عنوان یک عامل در پیشگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی، سکته مغزی و غیره می‌توان نام برد. اسیدفولیک در تمام فعل‌وانفعالات بیولوژیکی که شامل انتقال واحدهای تک کربنه است دخالت می‌نماید. این ویتامین همچنین در چندین متابولیسم اساسی بخصوص تکثیر سریع سلول‌هایی نظیر گلبول‌های قرمز و سفید و سلول‌های مخاطی روده دخالت دارد و بدین ترتیب نقش بیوشیمیایی این ویتامین در تشکیل خون مشخص می‌گردد. عمل غنی‌سازی آرد به‌عنوان مناسب‌ترین حامل جهت حل ریشه‌ای این مسئله و مصونیت از تبعات جبران‌ناپذیر کمبود آهن و اسیدفولیک در جیره غذائی توسط مسئولین وزارت بهداشت انتخاب گردیده است. موضوع کنترل کیفی و کمی مواد غذایی از مباحث مهم در ارتباط با سبد غذایی افراد در هر جامعه محسوب می‌شود لذا در این خصوص لازم است تا انواع تشکیل‌دهنده‌های مختلف مواد غذایی ازجمله اسیدفولیک مورد آنالیز واقع گردد. اسیدفولیک شکل سنتزی فولات (شکل‌های محلول در آب ویتامین B9) است که به دلیل پایداری زیاد و رفع نیازمندی‌های تغذیه‌ای انسان در صنایع غذایی استفاده می‌شود. ویتامین B9 در طول دوره رشد و تقسیم سریع سلولی (سنتز نوکلئوتیدها) و تولید سلول‌های قرمز خونی نقش مهمی بازی می‌کند (۱). به این منظور غنی‌سازی آرد در حدود چندین برابر فولات‌های طبیعی موجود در نمونه‌های غذایی می‌باشد (۲). به‌طورکلی سنجش میکروبیولوژیکی، تنها روش اندازه‌گیری فولات کل تأییدشده توسط AOAC است (۱).

محدودیت‌های این روش شامل نبود اطلاعات کافی درخصوص شکل‌های منفرد فولات مانند اسیدفولیک، تداخل به‌دست‌آمده از بافت نمونه و نیاز به‌صرف زمان معادل ۵ روز است، ازاین‌رو امروزه پژوهش‌های گسترده‌ای برای اندازه‌گیری فولات با کروماتوگرافی مایع و الکتروفورز صورت گرفته است (۶-۳). روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری اسیدفولیک در نقاط مختلف دنیا ارائه گردیده است به‌طور مثال Osseyi و همکاران در سال ۱۹۹۸ میلادی به روش HPLC مقدار اسیدفولیک اضافه‌شده به چندین محلول ازجمله آرد را اندازه‌گیری نموده‌اند. آنان برای اندازه‌گیری از یک مرحله ساده استخراج همراه با یک مرحله هضم اسیدی نیز استفاده کردند. زمان بازداری ۱۵ دقیقه بود و از دتکتور UV در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر استفاده شده بود. حد تشخیص روش ۲ نانوگرم در ۲۰ میکرو لیتر نمونه بود. درصد بازیابی برای اسیدفولیک در غلظت‌های اضافه‌شده ۳/۰۸ و ۲۰ میکروگرم بر گرم آرد به ترتیب ۹۳درصد و ۹۶درصد بود (۷).

در سال ۲۰۰۵ نیز Gujska و همکاران پروژه‌ای را برای اندازه‌گیری اسیدفولیک با استفاده از HPLC انجام دادند که جهت مقایسه مقادیر اسیدفولیک در آردهای غنی‌شده و نان‌های پخته‌شده بود. این محققین سعی نمودند که تأثیر مراحل فرمانتاسیون و پخت را در مقادیر این ویتامین پیدا کنند. نتایج به‌دست‌آمده کاهش ۱۲ تا ۲۱ درصدی از مقدار اسیدفولیک را معلوم نمود. برای این منظور از ستون C18 و دتکتور UV در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر و همچنین از دتکتور فلورسانس در طول‌موج تهییجی ۲۹۰ نانومتر و طول‌موج نشری ۳۵۶ نانومتر و فاز متحرک استونیتریل به‌صورت گرادیان در محدوده ۰/۵درصد تا ۱۷/۵درصد استفاده شد (۸). Nelson و همکاران در سال ۲۰۰۶ دو روش ایزوتوپی برای اندازه‌گیری مقدار اسیدفولیک در قرص‌های حاوی ویتامین‌ها و سایر عناصر با HPLC مجهز به دتکتور اسپکتروسکوپی جرمی (LC/MS/MS) ارائه نمودند. روش‌های ارائه‌شده دارای محدوده خطی دینامیک سه برابر وسیع‌تر و حد تشخیص ۰/۰۲ نانوگرم و حد اندازه‌گیری ۰/۰۶ نانوگرم برای اسیدفولیک بود (۹). Prieto و همکاران در سال ۲۰۰۶ از HPLC برای اندازه‌گیری اسیدفولیک در محصولات غلات غنی‌شده راه‌اندازی نمودند. مراحل شامل استخراج و خالص‌سازی توسط کروماتوگرافی آفینیتی بود. سپس نمونه‌ها با روش HPLC مجهز به دتکتورهای UV و فلورسانس تعیین مقدار گردید. روش در فاصله غلظتی ۳-۰/۱ میکرو مول بر لیتر خطی بود. مقدار CV برای اسیدفولیک در ۵ نمونه تجارتی برای اندازه‌گیری در یک روز ۲درصد و در ۵ روز متوالی ۷/۲درصد به‌دست‌آمده است. این روش با روش میکروبیولوژی همخوانی خوبی داشت (۱۰). Lebiedzinska و همکاران در سال ۲۰۰۸ از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا فاز معکوس کوپل شده با دتکتور الکتروشیمیایی کولومتری را به‌طور موفقیت‌آمیزی برای اندازه‌گیری کیفی اسیدفولیک در آب‌میوه‌های غنی‌شده و محصولات غله‌ای استفاده نمودند. روش قادر به جداسازی خوب اسیدفولیک و مشتق آن را در نمونه‌های غلات فراهم نمود. فاز متحرک حاوی ۴۰ میلی‌مولار بافر سدیم فسفات دی بازیک هفت آبه و ۸درصد استونیتریل با

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 17:58 +0330 on Saturday September 23rd 2017

سرعت جریان ۰/۹ میلی‌لیتر بر دقیقه بود و از ستون C18 به‌عنوان فاز متحرک استفاده شده بود (۱۱).

در سال ۲۰۱۱ Deconinck و همکاران روش کاملاً معتبری از UHPLC برای اندازه‌گیری کیفی و کمی مقادیر اسیدفولیک در فراورده‌های دارویی ارائه نمودند. شرایط شروع کار از روش‌های کاری قبلی HPLC انتخاب شد. با این شرایط ستون‌های مختلف UHPLC، HTTM C18-P، C18، C18-HI و C18-B موردبررسی قرار گرفت و پس از انتخاب ستون دو فاز آبی و دو فاز آلی به‌عنوان فاز متحرک به‌طور گرادیان موردبررسی قرار گرفت (۱۲). Jin و همکاران در سال ۲۰۱۲ روشی ساده، ایزوکراتیک و پایا از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) برای اندازه‌گیری ویتامین‌های B1, B2, B3, B5, B6 و C و ویتامین B9 (اسیدفولیک) در قرص‌های ویتامین ارائه نمودند. برای این منظور از یک ستون C18 معمولی در دمای محیط و از استونیتریل حاوی ۵۰ میلی‌مولار آمونیوم دی هیدروژن فسفات با pH حدود ۳ (تثبیت‌شده با اسید فسفریک) با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده نمودند (۱۳). Alaburda و همکاران در سال ۲۰۰۸ میلادی با HPLC مقدار اسیدفولیک را در آردهای غنی‌شده با این ویتامین را اندازه‌گیری نمودند. در این روش از دتکتور UV استفاده شد. مراحل شامل استخراج با تامپون تترابورات و تری کلرواستیک اسید و سپس خالص‌سازی به کمک کارتریج بوده است (۱۴).

باوجود اینکه در ایران عمل غنی‌سازی آردهای مورد مصرف نانوائی‌ها با اسیدفولیک انجام می‌گردد ولی روش عملی برای کنترل و اندازه‌گیری مقدار اسیدفولیک در آردهای غنی‌شده وجود ندارد لذا در این پروژه ما بر آن شدیم که یک روش ساده و دقیق برای تعیین مقدار اسیدفولیک راه‌اندازی بنماییم.

مواد و روش کار

ترکیبات بکار رفته در این پژوهش مواد خالص با درجه خلوص در حد کروماتوگرافی بودند که عبارت‌اند از:

اسیدفولیک از شرکت سیگما- آلدریچ (Sigma-aldrich) و اسید فسفریک (۸۵٪W/W)، محلول آمونیاک (۲۵درصد)، سدیم استات، پتاسیم پرمنگنات، هیدروژن پراکسید، پتاسیم منو هیدروژن فسفات، پتاسیم دی هیدروژن فسفات و متانول با درجه خلوص در حد کروماتوگرافی همگی از شرکت مرک (Merck) تهیه گردید.

دستگاه‌های مورداستفاده:

تجهیزات آزمایشگاهی بکار رفته در این پژوهش عبارت بودند از: دستگاه HPLC ساخت شرکت CECIL Biotech 2003 degasser, Ultrafluor detector, CE 4300, (Chromatography system manager CE 4900

ترازو دیجیتال ساخت شرکت ACCULAB (مدل ALC) با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم

همزن مغناطیسی ساخت شرکت Pars Azma Co مدل ST 04

شیکرساخت شرکت GFL Co مدل 3031

شیکرساخت شرکت Bioer Co مدل Mixing block MB-102

سانتریفوژ شیکرساخت شرکت Eppendorf Co مدل 5810

دستگاه آب دیونیزه کننده ساخت شرکت ELGA مجهز به فیلتر LC 136

دستگاه pH متر ساخت شرکت Metrohm مدل 827 pHlab

دستگاه اولترا سونیک کلینر ساخت شرکت مهندسی پارس نهند مدل Parsonic 2600S

آماده‌سازی استانداردها و رسم منحنی کالیبراسیون:

با توجه به اینکه اسیدفولیک دارای حساسیت کم فلورسانس می‌باشد لذا به‌منظور آشکارسازی ابتدا اسیدفولیک در حضور بافر استات در pH حدود ۴ توسط پرمنگنات به فلئوروفور، ۲- آمینو - ۴- هیدروکسی پتریدین – ۶- کربوکسیلیک اسید تبدیل و سپس ترکیب موردنظر که خاصیت فلورسانس داشته وهم غلظت با اسیدفولیک بود مورداندازه‌گیری قرار گرفت (شکل ۱).

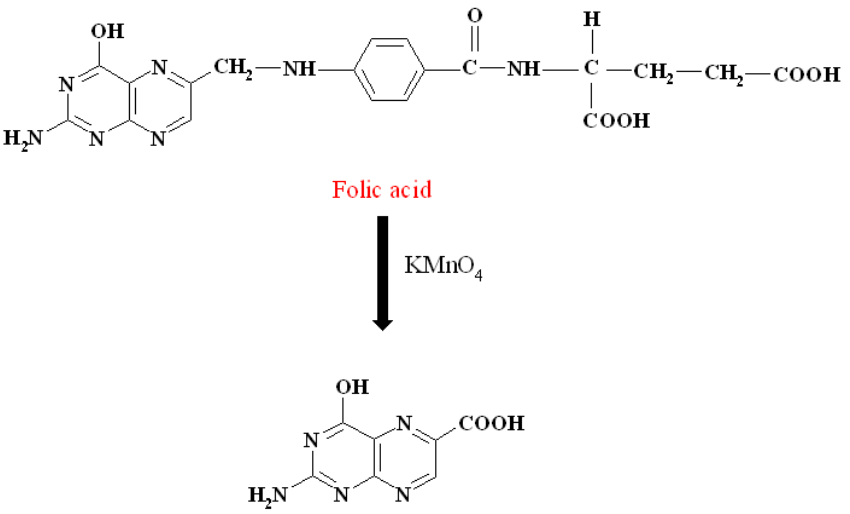
برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از نمونه استاندارد در محدوده غلظتی انتخاب و پس از تثبیت pH نمونه استاندارد در ۴، ۱۴۰ میکرولیتر بافر استات به غلظت ۰/۲ مولار، ۵۰ میکرولیتر محلول پرمنگنات ۰/۱ مولار به نمونه استاندارد موردنظر اضافه‌شده و به مدت ۱ دقیقه بهم زده می‌شود و سپس ۴ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۶۰۰ دور بر دقیقه توسط شیکر هم زده شده تا در این دما واکنش تبدیل اسیدفولیک به فلئوروفور موردنظر به‌طور کامل صورت گیرد. حال با افزودن حدود ۵۰ میکرولیتر محلول آب‌اکسیژنه ۰/۷۵ مولار مازاد پرمنگنات به منگنز (II) تبدیل‌شده و نمونه استاندارد پس از ۳۰ ثانیه اولتراسونیک شدن آماده تزریق به دستگاه HPLC خواهد بود که حدود ۲۰ میکرولیتر از این نمونه به دستگاه تزریق و توسط دتکتور فلورسانس آشکارسازی و اندازه‌گیری صورت گرفته است (۱۵).

جهت تشخیص و اندازه‌گیری مقادیر اسیدفولیک از دتکتور فلورسانس با طول‌موج تحریکی ۲۹۶ نانومتر و طول‌موج نشری ۴۴۰ نانومتر استفاده گردید. زمان بازداری برای اسیدفولیک ۱/۰۷ دقیقه به دست آمد. با تزریق غلظت‌های مختلف اسیدفولیک به سیستم، شدت پاسخ‌های متفاوتی نیز توسط آشکارساز حاصل می‌گردد که با کمک داده‌های به‌دست‌آمده، یک منحنی استاندارد برحسب شدت پاسخ آشکارساز نسبت به غلظت‌های مختلف

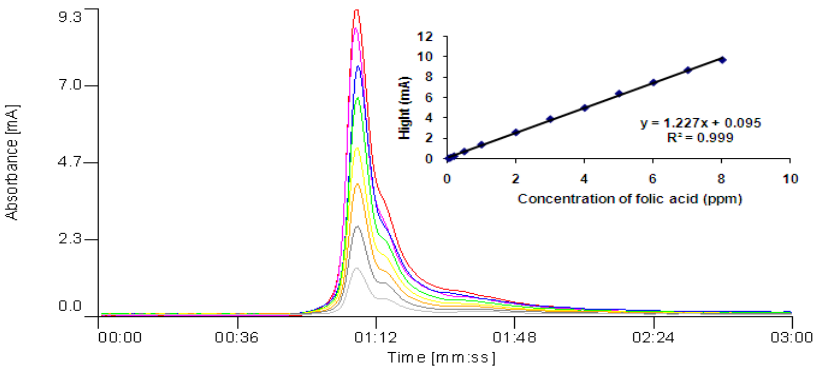
Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 17:58 +0330 on Saturday September 23rd 2017

محلول استاندارد اسیدفولیک ترسیم می‌گردد. نتایج مربوط به این منحنی نشان‌دهنده وجود یک رابطه خطی بین غلظت ماده مؤثره و شدت پاسخ آشکارساز در محدوده ۰/۱ تا ۸ میکروگرم بر لیتراست. مقدار ضریب همبستگی منحنی $R^2 = 0.999$ و معادله منحنی برابر $Y = 1.227X + 0.095$ حاصل شد (شکل ۲).

به‌عنوان فاز متحرک مخلوطی از متانول و آب دی یونیزه به نسبت ۲۰ به ۸۰ استفاده شد. سرعت جریان موبایل فاز ۱ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم گردید. سیستم HPLC شامل یک پمپ گرادیانت، ستون از نوع C18 به طول ۱۰ سانتیمتر و قطر ۴/۶ میلی‌متر بود.



شکل (۱): واکنش تبدیل اسیدفولیک به فلئوروفور موردراندازه‌گیری



شکل (۲): کروماتوگرام و نمودار کالیبراسیون نمونه‌های استاندارد اسیدفولیک در محدوده غلظتی ۸ – ۰/۱ میکروگرم بر لیتر.

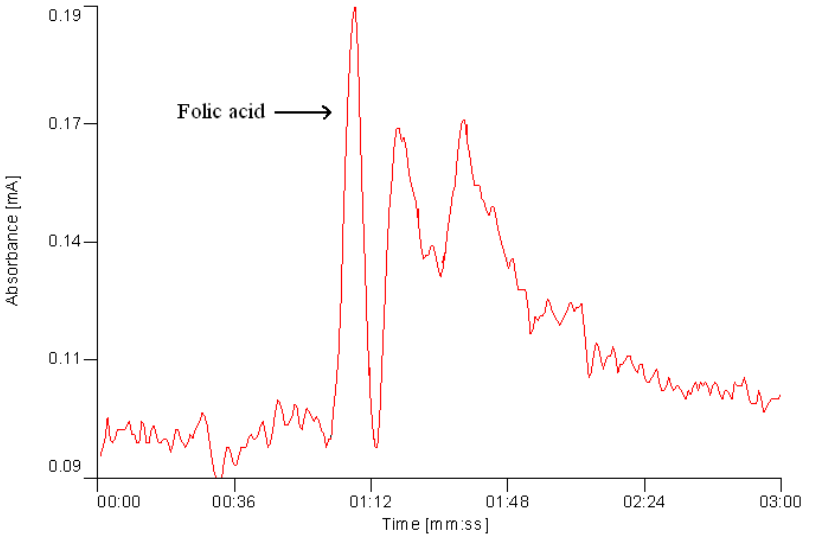
آماده‌سازی نمونه‌های حقیقی:

در تعیین تعداد نمونه‌های بکار رفته در این پژوهش از مطالعات قبلی استفاده گردید. حجم نمونه‌های مورد آنالیز به تعداد ۳۰ نانوائی در سطح شهر ارومیه بر اساس پراکندگی در مناطق جغرافیائی مختلف شهر انتخاب و از تمامی مناطق فوق تعداد ۳۰ عدد نان و ۳۰ عدد آرد به‌طور همزمان جمع‌آوری گردید. برای استخراج نمونه‌های حقیقی هم مقدار ۵ گرم از نمونه آرد یا نان توزین می‌گردد و توسط ۵۰ میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات با pH حدود ۹ به‌عنوان محلول استخراج‌کننده نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد توسط شیکر هم زده شد و پس از تثبیت pH نمونه با اسید فسفریک در ۷، نمونه موردنظر به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. سپس

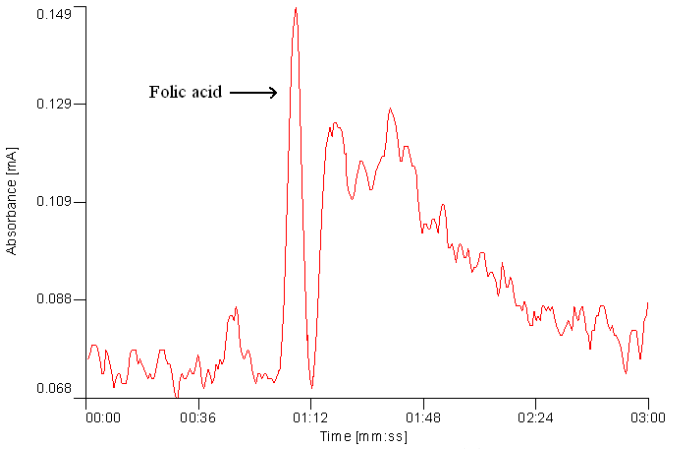
Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 17:58 +0330 on Saturday September 23rd 2017

محلول استخراج‌شده از فیلتر ۰/۴۵ میکرونی عبور داده شد و ۱۰ میکرولیتر از نمونه استخراجی مشابه نمونه‌های استاندارد پس از تثبیت pH نمونه در حدود ۴ توسط ۱۴۰ میکرولیتر بافر استات به غلظت ۰/۲ مولار، ۵۰ میکرولیتر محلول پرمنگنات ۰/۱ مولار به نمونه موردنظر اضافه‌شده و به مدت ۱ دقیقه هم زده شده و سپس ۴ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۶۰۰ دور بر دقیقه توسط شیکر هم زده شده تا در این دما واکنش تبدیل اسیدفولیک به فلئوروفور موردنظر به‌طور کامل صورت گیرد. حال با افزودن حدود ۵۰ میکرولیتر محلول آب‌اکسیژنه ۰/۷۵ مولار مازاد پرمنگنات به منگنز (II) تبدیل شده و نمونه استاندارد پس از ۳۰ ثانیه اولتراسونیک شدن آماده تزریق به دستگاه HPLC خواهد بود که حدود ۲۰ میکرولیتر از این نمونه به دستگاه تزریق و توسط دتکتور فلورسانس آشکارسازی و اندازه‌گیری صورت گرفته است (۸).

در شکل‌های ۳ و ۴ دو کروماتوگرام از دو نمونه آرد و نان به همراه پیک مربوط به اسیدفولیک در هر مورد آورده شده است؛ که امکان اندازه‌گیری دقیق اسیدفولیک را در نان و آرد با دقت بالا را نمایش می‌دهد.



شکل (۳): کروماتوگرام اسیدفولیک برای نمونه آرد



شکل (۴): کروماتوگرام اسیدفولیک برای نمونه نان

تعیین حد حساسیت روش اندازه‌گیری:

برای تعیین حد حساسیت روش اندازه‌گیری، غلظت‌های مختلف از محلول استاندارد اسیدفولیک تهیه شده و پس از انجام

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 17:58 +0330 on Saturday September 23rd 2017

مراحل آماده‌سازی و تبدیل به فلئوروفور موردنظر به دستگاه کروماتوگرافی تزریق گردید تا حد حساسیت روش اندازه‌گیری نمونه، مشخص گردد. در این روش حد تشخیص ۰/۰۳ میکروگرم بر لیتر حاصل گردید.

بررسی دقت و صحت روش:

میزان دقت و صحت (تکرارپذیری نتایج) روش تجزیه ای انتخاب شده با محاسبه دقت و صحت نتایج حاصل از آنالیز نمونه قابل ارزیابی است. به این منظور میزان تغییرات Intra-day و Inter-day از طریق محاسبه مقدار انحراف استاندارد و ضریب واریانس مورد بررسی قرار می‌گیرد.

بررسی تغییرات Inter-day:

به‌منظور پایش تغییرات Inter-day، ۳ غلظت مختلف محلول استاندارد اسیدفولیک (میلی گرم بر لیتر یا ppm) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج ۳ بار تکرار اندازه‌گیری هریک از نمونه‌های فوق در سه روز متوالی در جدول آورده شده است.

جدول (۱): نتایج مربوط به بررسی تغییرات Inter - day غلظت‌های مختلف محلول استاندارد اسیدفولیک

ردیف	غلظت استاندارد ($mg\ L^{-1}$)	میانگین غلظت اندازه‌گیری شده ($mg\ L^{-1}$)	SD	Precision	Accuracy
۱	۰/۲	۰/۱۹	۰/۰۰	۲/۳۷	۹۸/۸
۲	۴	۴/۲۷	۰/۱۷	۳/۹۵	۱۰۶/۹
۳	۷	۶/۹۸	۰/۳۵	۵/۰۷	۹۹/۷

بررسی تغییرات Intra-day:

به‌منظور پایش تغییرات Intra-day، این‌بار نیز ۳ غلظت متفاوت محلول اسیدفولیک مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تکرار اندازه‌گیری هریک از نمونه‌های فوق در ۳ روز متوالی در جدول آورده شده است.

جدول (۲): نتایج مربوط به بررسی تغییرات Intra-day غلظت‌های مختلف محلول استاندارد اسیدفولیک

ردیف	غلظت استاندارد ($mg\ L^{-1}$)	میانگین غلظت اندازه‌گیری شده ($mg\ L^{-1}$)	SD	Precision	Accuracy
۱	۰/۲	۰/۲۱	۰/۰۱	۷/۳۲	۱۰۱/۹
۲	۴	۴/۱۵	۰/۳۲	۷/۸۲	۱۰۳/۷
۳	۷	۶/۹۴	۰/۲۱	۳/۰۹	۹۹/۲

بررسی تغییرات Inter-day در نمونه حقیقی:

به‌منظور پایش تغییرات Inter-day در نمونه‌های حقیقی، ۵ نمونه آرد و ۵ نمونه نان به‌طور تصادفی با سه تکرار برای هر نمونه اندازه‌گیری شد و نتایج حاصل در جدول (۳) خلاصه شده است.

جدول (۳): نتایج مربوط به بررسی تغییرات Inter – day اسیدفولیک در پنج نمونه آرد و نان

ردیف	نمونه آرد			نمونه نان		
	اسیدفولیک (mg g-1)	SD	Precision	اسیدفولیک (mg g-1)	SD	Precision
۱	۱/۱۹	۰/۱۴	۱۱/۸۳	۰/۹۸	۰/۰۷	۶/۹۹
۲	۰/۹۸	۰/۰۸	۸/۶۴	۰/۹۵	۰/۰۲	۲/۱۹
۳	۱/۱۳	۰/۰۷	۶/۰۲	۰/۹۵	۰/۰۱	۰/۷۳
۴	۱/۱۷	۰/۱۴	۱۱/۶۲	۰/۷۸	۰/۰۲	۲/۱۰
۵	۰/۸۵	۰/۰۲	۱/۷۹	۰/۶۷	۰/۰۹	۱۲/۸۰

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 17:58 +0330 on Saturday September 23rd 2017

درصد میزان استخراج اسیدفولیک:
به‌منظور بررسی درصد استخراج اسیدفولیک یک نمونه آرد و یک نمونه نان برداشته شده و به روش افزایش استاندارد درصد استخراج و اثر ماتریکس آرد و نان در فرایند استخراج اسیدفولیک مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایشات سه بار بر روی هر نمونه انجام شده و نتایج زیر حاصل گردید (جدول ۴). بررسی نتایج نشان‌دهنده استخراج حدود ۷۲درصد اسیدفولیک در نمونه‌های آرد و نان را نشان می‌دهد.

جدول (۴): نتایج مربوط به افزایش استاندارد و درصد استخراج

ردیف	نمونه	بدون افزایش استاندارد			با افزایش استاندارد			درصد استخراج
		اسیدفولیک ($mg\ g^{-1}$)	SD	Precision	اسیدفولیک ($mg\ g^{-1}$)	SD	Precision	
۱	آرد	۰/۵۴	۰/۰۴	۷/۴۱	۰/۷۵	۰/۰۷	۹/۳۳	۷۲/۳۶
۲	نان	۰/۵۱	۰/۰۳	۶/۹۳	۰/۷۰	۰/۰۵	۷/۱۴	۷۲/۵۹

یافته‌ها

همان‌طور که در مقدمه نیز اشاره شد، روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری اسیدفولیک در محافل علمی وجود دارد ولی عملاً روش دقیق و مورداطمینانی تابه‌حال در ایران ارائه نشده است که با توجه به مطالعات انجام‌یافته و بررسی مقالات متعدد در این زمینه، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با استفاده از دتکتور فلورسانس به دلیل حساسیت بالا برای آنالیز میزان اسیدفولیک در نمونه‌های آرد و نان غنی‌شده مورداستفاده قرار گرفت. در این روش، پس از رسم منحنی کالیبراسیون استاندارد و استخراج اسیدفولیک از نمونه آرد و نان، میزان آن توسط دستگاه HPLC موردااندازه‌گیری قرار گرفت. به‌منظور بررسی تکرارپذیری (دقت و صحت) سیستم و روش آنالیز، تغییرات درون روزی و بین روزی نیز مورد بررسی قرا گرفتند. نتایج آنالیزها نشان دادند که ضریب تغییرات درون روزی برای ۳ غلظت ذکر شده، بین ۵/۰۷ – ۲/۳۷ قرار داشت. برای تغییرات بین روزی نیز ۳ غلظت مختلف ذکر شده مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آنالیز آن‌ها نیز نشان داد که ضریب تغییرات بین روزی بین ۷/۸۲ – ۳/۰۹ قرار داشت. روش افزایش استاندارد نیز به‌منظور بررسی درصد استخراج و اثر ماتریکس آرد و نان در فرایند استخراج اسیدفولیک مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایشات سه بار بر روی هر نمونه انجام شد. بررسی نتایج نشان‌دهنده استخراج حدود ۷۲درصد در نمونه‌های آرد و نان می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

فقر آهن و اسیدفولیک یکی از شایع‌ترین اختلالات تغذیه‌ای در کشورهای درحال‌توسعه و مهم‌ترین نوع کم‌خونی در زنان در سنین باروری و کودکان است. جهت حل ریشه‌ای مسئله و مصونیت از تبعات جبران‌ناپذیر کمبود آهن و اسیدفولیک در جیره غذائی، نان که به‌عنوان قوت غالب اکثر خانواده‌های ایرانی محسوب شده و به سادگی در دسترس همه قرار می‌گیرد و با در نظر گرفتن پارامترهای مختلف، آرد به‌عنوان مناسب‌ترین حامل برای امر غنی‌سازی توسط مسئولین وزارت بهداشت انتخاب گردیده است. به‌منظورکنترل کیفی و کمی مواد غذایی لازم است تا انواع تشکیل دهنده‌های مختلف مواد غذایی ازجمله اسیدفولیک مورداندازه‌گیری واقع گردد.

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری اسیدفولیک در مقالات علمی ارائه گردیده است. از آنجائی که اسیدفولیک خاصیت فلورسانس ندارد لذا ما، در این روش جدید سعی نمودیم اسیدفولیک را به فرم فلئوروفور جهت نمایان ساختن خصوصیات فلورسانس تبدیل بنمائم. در سال ۱۹۹۳ آقای Ichinose و همکاران در کشور ژاپن با اکسیداسیون اسیدفولیک توسط پرمنگانات در محیط آزمایشگاهی توانستند اسیدفولیک را با اسپکتروفتومتری فلورسانس اندازه‌گیری بنمایند که ما در این پروژه ایده آنان را با تغییرات بیشتری، در محیط بیولوژیک پیاده نمودیم (۱۵) . در این روش ابتدا بعد از عمل استخراج و تنظیم pH اسیدفولیک موجود در آرد غنی‌شده و نان اقدام به اکسیداسیون اسیدفولیک موجود در محیط نمودیم و با دتکتور فلورسانس با طول‌موج تحریکی ۲۹۶ نانومتر و طول‌موج نشری ۴۴۰ نانومتر جذب حاصله را اندازه‌گیری نمودیم. در اثر اکسیداسیون اسیدفولیک توسط پرمنگانات یک ماده قوی با خاصیت فلورسانس بنام 2-amini-4-hydroxy pteridine-6-carboxylic acid حاصل می‌گردد. افزایش خصوصیات فلورسانسی اسیدفولیک می‌تواند حساسیت روش اندازه‌گیری را بسیار افزایش داده و همچنین کاربرد آن را در محیط‌های بیولوژیک بخاطر وجود بسیار زیاد ماتریکس و سایر مواد زمینه ای، اندازه‌گیری آن را اختصاصی تر بنماید.

ما در این روش چندین روش استخراج را مورد مطالعه قرار دادیم که بتوانیم محلول حاصله را با کمک مرحله اکسیداسیون به فرم فعال تبدیل نمائی‌ام که در نهایت روش استخراج آقای Alaburda در سال ۲۰۰۷ از کشور برزیل با تغییرات عمده جهت سازگاری با مرحله بعدی انتخاب گردید. در روش حاضر عمل استخراج با استفاده از بافر فسفات و تثبیت pH حدود ۹ نمونه واقعی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه به هم زده می‌شود و سپس باکاهش pH به ۷ توسط اسید فسفریک نمونه سانتریفوژ می‌گردد. دلیل

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 17:58 +0330 on Saturday September 23rd 2017

این تغییرات pH بخاطر افزایش در صد استخراج و به دست آوردن محلول با ظاهر صاف و همگن می‌باشد تا بتوانیم زمینه عاری از مواد مزاحم در رسم کروماتوگرافی داشته باشیم. نمونه به‌دست‌آمده از سانتریفوژ فیلتره شده و مقدارمشخصی از آن بعد از تثبیت pH در ۴ بکمک بافر استات با محلول پرمنگنات مجاور می‌گردد. نمونه در دمای ۶۰ درجه جهت تکمیل شدن واکنش اکسیداسیون به هم زده می‌شود و در نهایت با افزودن آب‌اکسیژنه مازاد پرمنگنات حذف شده ونمونه بعد از اولتراسونیک آماده تزریق به ستون کروماتوگرافی است.

روش ارائه شده توسط گروه ما از لحاظ در صد استخراج مورد ارزیابی قرار گرفت و اگر چه مقدار آن نسبت به بعضی از مقالات علمی کمتر بود ازجمله روش‌های استخراج بکار رفته توسط آقای Alaburda و Osseyi ولی اختصاصی بودن روش و بالا بودن حساسیت آن می‌تواند این روش را در محیط‌های بیولوژیک بخاطر امکان اندازه‌گیری بامقادیر کمتر اسیدفولیک به همراه مواد مزاحم بسیار متنوع، کاربردی تر بنماید. از طرفی با توجه به اینکه در روش ارائه شده مرحله آنزیمی طولانی مدت و فیلتر نمودن با کارتریج وجود ندارد که این مراحل موجب طولانی شدن اندازه‌گیری و افزایش هزینه‌های جانبی را خواهد داشت که می‌تواند مزیتی بر روش ما به حساب آید.

با تمامی اوصاف فوق این روش می‌تواند به‌عنوان یک روش عملی با حساسیت بالا، قابلیت انجام آن در آزمایشگاه‌های کنترل و کوتاه بودن زمان آزمایش مناسب باشد. برای کنترل و اندازه‌گیری مقدار اسیدفولیک در آردهای غنی‌شده در ایران روش مناسبی وجود ندارد که با استفاده از روش ارائه شده می‌توان میزان اسیدفولیک در آرد و نان را به‌طور دقیق مورد آنالیز قرار داد. نتایج حاصل از آنالیزها در خصوص میزان تکرارپذیری، صحت و دقت روش، میزان درصد بازیافت و حد تشخیص روش، همگی بیانگر اعتبار علمی و عملی این روش آنالیز می‌باشند و نیز همخوانی نتایج به‌دست‌آمده با نتایج سایر منابع علمی تائید کننده این مسئله می‌باشد.

Refrences:

1. Lim H.S, Mackey A.D, Tamura T, Wong S.C, Picciano M.F. Measurable Human Milk Folate is Increased by Treatment with-Amylase and Proteases in Addition to Folate Conjugase. Food Chem 1998; 63: 401-7.
2. Arcot J, Shrestha A.K, Gusanov U. Enzyme Protein Binding Assay for Determining Folic Acid in Fortified Cereal foods and Stability of Folic Acid Under Different Extraction Conditions. Food Control 2002; 13: 245-52.
3. Smith R.M. Before the Injection-Modern Methods of Sample Preparation for Separation Techniques. J Chromatogr A 2003; 1000: 3-27.
4. Lord H, Pawliszyn J. Microextraction of Drugs. J Chromatogr A 2000; 902: 17-63.
5. Belardi R.G, Pawliszyn J. The Application of Chemically Modified Fused silica Fibers in the Extraction of Organics from Water Matrix Samples and Their Rapid Transfer to Capillary Column, Water Pollut. Res J Can 1989; 24: 179-91.
6. Arthur C.L, Pawliszyn J, Capillary Isoelectric Focusing with Whole Column Detection and a Membrane Sample Preparation System. Anal Chem 1990; 62: 2145-8.
7. Osseyi E.S, Wehling R.L, Albrecht A.J. Liquid chromatography method for determining added folic acid in fortified cereal products. J. Chromatogr A 1998; 826: 235-40.
8. Gujska E, Majewska K. Effect of baking process on added folic acid and endogenous folates stability in wheat and rye breads. Plant Food Hum Nutr 2005; 60: 37-42.
9. Nelson B.C, Sharpless K.E, Sander L.C. Quantitative determination of folic acid in multivitamin/multielement tablets using liquid chromatographt/tandem mass spectrometry. J. Chromatogr A 2006; 1135: 203-11.
10. Póo-Prieto R, Haytowitz D.B. Use of the affinity/HPLC method for quantitative estimation of folic acid in enriched cereal-grain products. The J. Of Nutrition Methodology and Mathematical Modeling 2006; 136: 3079-83.
11. Lebiedzińska A, Dąbrowska M, Szefer P. High-performane liquid chromatography method for determination of folic acid in fortified food products. Toxicol Mech Methods 2008; 18: 463-7.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 17:58 +0330 on Saturday September 23rd 2017

12. Deconinck E, Crevits S, Baten P, Courselle P, De Beer J. A validated ultra high pressure liquid chromatographic method for qualification and quantification of folic acid in pharmaceutical preparations. J Pharmaceut Biomed 2011; 54: 995-1000.
13. Jin P, Xiz L, Li Z, Zou D, HU X. Rapid determination of thiamine, riboflavin, niacinamide, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and ascorbic acid in vitamins with minerals tablets by high-performance liquid chromatography with diode array detector. J Pharmaceut Biomed 2012; 70: 151-7.
14. Alburda J, Almelda A.P. Determination of folic acid in fortified wheat flours. J Food Compost Anal 2008; 21: 336-42.
15. Ichinose N, Tsuneyoshi T, Kato M, Suzuki T, Ikeda S. Fluorescent high-performance liquid chromatography of folic acid and its derivatives using permanganate as a fluorogenic reagent. Fresen J Anal Chem 1993; 346: 841-6.

Original Article

AN IMPROVED SIMPLE AND PRECISE HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF FOLIC ACID IN FORTIFIED WHEAT FLOURS AND BREADS WITH FLUORESCENCE DETECTION

Amir Heydari[1], Mohammad Reza Vardast[2], Samal Yeganeh Zare[3]*

Received: 23 Oct , 2014; Accepted: 15 Jan , 2015

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 17:58 +0330 on Saturday September 23rd 2017

Abstract

***Background & Aims*:** Folic acid is one of the important hematopoietic agents necessary for proper regeneration of the blood forming elements and their functioning. Since humans cannot synthesize folates, they must be obtained from dietary sources. The most important dietary sources of folates are fortified foods and cereal products with folate content of 50-200 µg/100 g. In Iran the majority of people consume bread as an ideal food because of its low price and availability. The objective of this study was to develop a simple and precise High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for determination of folic acid in enriched wheat flours and bread.

***Materials & Methods*:** The method combines several procedures including an extraction technique, oxidation of folic acid to increase fluorescent properties, and an improved HPLC with fluorescence detection method. The method was performed on a C18 analytical column. The mobile phase consisted of a mixture of methanol and pure water (20/80).The elute was continuously monitored using a fluorescence detector (λ_{ex} 296 nm and λ_{em} 440 nm).

***Results*:** The standard curve for folic acid passed through the origin and was linear over the range 0.1 – 8µg/L. The peak of folic acid appeared as sharp with retention times of 1.12 minutes. The intra-day coefficient of variation was evaluated in the range of 3.09-7.82 µg/L. The Inter day coefficients of variation for the method ranged between 2.37 and 5.07 µg/L. The accuracy of the method ranges between 99.2% and 103.7% for intra-day analysis and 98.8% and 106.9% for inter-days analysis. The limit of determination for folic acid was 0.03µg/L. The mean concentration of folic acid was 102 µg and 85 µg per 100 gram of flour and bread respectively. The amount of folic acid was decreased during preparation and fermentation process (16.67%).

***Conclusions*:** The obtained results indicated that this method is a rapid, sensitive, and precise technique for measurement of folic acid in enriched wheat flours and breads.

***Keywords*:** Folic acid, HPLC, Flour, Bread

Address: Food and Beverages Safety Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran, ***Tel***: +9844 32754991
Email: heydari.866@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2015: 25(12): 1111 ISSN: 1027-3727

[1] *Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Food and Beverages Safety Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[2] *Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[3] *Food and Beverages Safety Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*