Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:11 +0330 on Friday February 23rd 2018

مقاله پژوهشی

اندازه‌گیری و مقایسه مقدار اسیدفولیک در آردهای غنی‌شده و نان به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) در شهر ارومیه

امیر حیدری [۱]، محمدرضا وردست [۲]، سامال یگانه زارع [۳]، ناهید افرنگ [۳]، سمیرا فهیمی [۳]

تاریخ دریافت ۱۳۹۴/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۲/۱۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: نقش اسیدفولیک در عمل متابولیسم سلولی و رشد سلول‌های بدن بسیار حائز اهمیت است و به خاطر عدم سنتز آن در بدن ضرورت تأمین اسیدفولیک توسط رژیم غذائی بیشتر احساس می‌گردد. با توجه به مشکلات ناشی از فقر آهن و اسیدفولیک در بسیاری از کشورهای جهان بخصوص کشورهای درحال توسعه و فقیر، این ضرورت بیشتر احساس می‌گردد. سیاست الزام‌آور دولت در غنی‌سازی آرد توسط کارخانه‌های آردسازی ممکن است نیاز واقعی اکثریت جامعه را تأمین بنماید. بر اساس این ایده برای کنترل کمی اسیدفولیک در آردهای غنی‌شده ارومیه و همچنین تعیین میزان اسیدفولیک در نان برای مقایسه احتمال کاهش اسیدفولیک در پروسه پخت این پروژه طراحی گردید.

مواد و روش کار: برای این منظور انواع آرد و نان از نانوایی‌های سطح شهر و کارخانه‌های مختلف تأمین‌کننده آرد شهر جمع‌آوری و تهیه شد و پس از استخراج اسیدفولیک موجود در این نمونه‌ها و تبدیل آن به فرم قابلیت فلئورسانس طی فرایند اکسیداسیون، مقادیر آن توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالاHPLC که مجهز به آشکارساز فلورسانس بود اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصله از اندازه‌گیری اسیدفولیک در ۳۰ نمونه از نانوائی‌های شهر ارومیه، به ترتیب نشان‌دهنده ۱/۰۲ و ۰/۸۵ میکروگرم اسیدفولیک در هر گرم آرد و نان نانوائی‌های سطح شهر می‌باشد. مقدار اسیدفولیک در نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از ۵ کارخانه آردسازی سطح شهر ارومیه نشانگر مقادیر ۲/۴۰ و ۱/۰۷ میکروگرم در هر گرم آرد به ترتیب برای نمونه‌های آرد غنی‌شده و غنی نشده بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج قابل‌انتظار از نمونه‌های غنی‌شده آرد و مقایسه آن با آردهای سطح شهر ارومیه، نشان‌دهنده این واقعیت است که متأسفانه افزایش اسیدفولیک در پروسه غنی‌سازی تنها ۲۵ درصد عملی گردیده و همچنین به نظر می‌رسد که در طی پروسه پخت نان، مقدار اسیدفولیک ۱۷ درصد کاهش می‌یابد.

کلیدواژه‌ها: اسیدفولیک، آرد غنی‌شده، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره سوم، ص ۱۹۷-۱۸۷، خرداد ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: ارومیه - دانشگاه علوم پزشکی ارومیه- دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی، تلفن: ۰۴۴ ۳۲۷۵ ۴۹۹۱

Email: Heydari.866@gmail.com

مقدمه

فولات از دسته ویتامین‌های گروه B است که محلول در آب بوده و مقادیر اضافی آن در بدن ذخیره نشده و از طریق ادرار دفع می‌شود. به همین دلیل باید همواره از طریق مواد غذایی به بدن رسانده شود. شکل سنتتیک این ویتامین اسیدفولیک است که به حالت طبیعی در مواد غذایی وجود ندارد بلکه به حالت فولات در مواد غذایی بخصوص در سبزی‌های دارای برگ سبز، مرکبات، بادام‌زمینی و ... یافت می‌شود. اسیدفولیک یکی از ریزمغذی‌های مهم در ارتقا سطح سلامت جامعه محسوب می‌گردد. چراکه این ویتامین در تمام فعل‌وانفعالات بیولوژیکی که شامل انتقال واحدهای تک‌کربنه است دخیل بوده و در چندین متابولیسم اساسی بخصوص تکثیر سلول‌هایی نظیر گلبول‌های قرمز و سفید و سلول‌های مخاطی روده دخالت دارد. در مطالعات جامعی که اواخر سال ۱۹۸۰ در امریکا انجام گردید مشخص شد که ۹۰درصد مردم مبتلابه کمبود اسیدفولیک هستند. کمبود اسیدفولیک ممکن است درنتیجه مصرف ناکافی، اختلال در جذب، افزایش احتیاج یا اختلال متابولیسم و یا

[۱] دانشیار، گروه فارماکولوژی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)

[۲] استادیار، گروه شیمی دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

[۳] مسئول آزمایشگاه، مرکز تحقیقات سلامت مواد غذایی و آشامیدنی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:11 +0330 on Friday February 23rd 2018

از دست دادن زیاد آن روی دهد. عوارض کمبود طولانی‌مدت آن در یک فرد بالغ کم‌خونی، تورم و قرمز شدن زبان، اختلالات گوارشی مانند اسهال و اختلالات روحی نظیر افسردگی می‌باشد. همچنین تأثیر کمبود آن در کودکان به‌صورت کاهش رشد، نمود پیدا می‌کند (۱).

غنی‌سازی مواد غذایی با ریزمغذی‌ها در مقایسه با سایر راهکارهای پیشگیری و کنترل کمبود ریزمغذی‌ها، به‌عنوان ارزان‌ترین و مؤثرترین راه برای کاهش شیوع کمبود ریزمغذی‌ها در دنیا مطرح است. مطالعات زیادی در زمینه غنی‌سازی مواد غذایی مختلف با اسیدفولیک و روش‌های اندازه‌گیری این ویتامین انجام یافته است، Breithaupt و همکاران در سال ۲۰۰۱ میلادی مقدار اسیدفولیک را با HPLC در آب‌میوه‌های غنی‌شده با این ویتامین اندازه‌گیری نمودند. اندازه‌گیری با یک استخراج فاز جامد و مرحله شستشو انجام گرفت. حد تشخیص ۰/۰۴ میلی‌گرم در لیتر بود. درصد بازیابی در دو نمونه با غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ در حدود ۹۷درصد بود. این روش برای آنالیز ۹ نمونه آب‌میوه تجاری که شامل اسیدفولیک در محدوده غلظتی ۰/۳- ۱/۴ بود بکار گرفته شد(۲). 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 (۳). Alaburda و همکاران در سال ۲۰۰۸ میلادی با HPLC مقدار اسیدفولیک را در آردهای غنی‌شده با این ویتامین را اندازه‌گیری نمودند. نتایج حاصل نشان داد که از ۳۳ نمونه آرد ۵۱درصد از نمونه‌ها کمتر از ۱/۵۵ میکروگرم بر گرم از اسیدفولیک داشتند (۴). در ایران نیز با توجه به اینکه نان غذای اصلی سبد غذایی قشر وسیعی از جامعه را تشکیل می‌دهد، طرح ملی غنی‌سازی آرد با آهن و اسیدفولیک در قالب ترکیبی به نام پرمیکس توسط تولیدکنندگان آرد از سال ۱۳۸۰ با نظارت وزارت بهداشت و درمان شروع گردید. فرمولاسیون این ترکیب به‌صورت ۴۲ گرم درصد سولفات فرو، ۰/۷۵ گرم درصد اسیدفولیک و ۵۷/۲۵ گرم درصد نشاسته (پرکننده) می‌باشد. بر طبق محاسبات، آرد غنی‌سازی شده با پرمیکس، حاوی ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آرد، سولفات فرو و ۱/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم آرد، اسیدفولیک می‌باشد.

در این پروژه به‌منظور حصول اطمینان از روند صحیح غنی سازی و کافی بودن میزان اسیدفولیک در آردهای غنی سازی شده و نیز اطمینان از توزیع یکنواخت پرمیکس در آرد، بر آن شدیم تا پایشی از وضعیت آردهای غنی‌سازی شده و نان‌های تهیه‌شده از آن‌ها در نانوائی‌های مختلف شهر ارومیه به عمل‌آوریم.

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 (W/W ۸۵در صد)، محلول آمونیاک (۲۵ در صد)، 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:

- دستگاه HPLC ساخت شرکت CECIL انگلستان CE 4300
- (Chromatography system manager CE 4900 Biotech 2003 degasser UltrafluorDetector)
- ترازو دیجیتال ساخت شرکت ACCULAB (مدل ALC) با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم
- همزن مغناطیسی ساخت شرکت Pars Azma Co مدل ST 04
- شیکر ساخت شرکت GFL Co مدل 3031
- شیکر ساخت شرکت Bioer Co مدل Mixing block MB-102
- سانتریفوژ شیکر ساخت 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

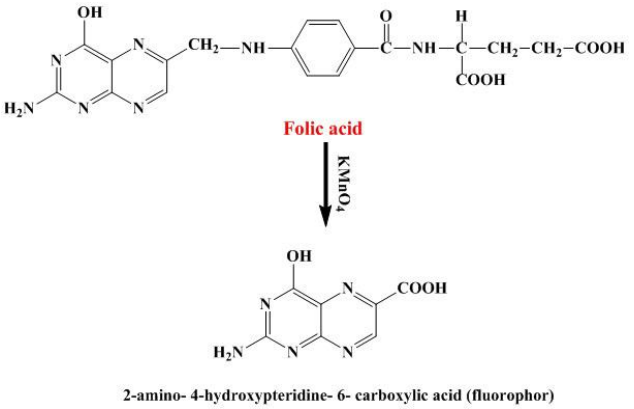
روش جمع‌آوری نمونه‌ها:

تعداد ۳۰ نمونه آرد و ۳۰ نمونه نان از ۳۰ نانوایی در مناطق مختلف سطح شهر ارومیه و دو نوع آرد، غنی شده و غنی نشده، از ۵ کارخانه مختلف توزیع‌کننده آرد در سطح شهر ارومیه جمع‌آوری و هرکدام از نمونه‌ها ازنظر اندازه‌گیری مقدار اسیدفولیک سه بار مورد آزمایش قرار گرفتند. در جمع‌آوری نمونه‌های آرد و نان سعی گردید که نمونه نان از همان نمونه آردی با شد که در تهیه آن بکار رفته بود.

روش اجرای آزمایش:

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:11 +0330 on Friday February 23rd 2018

برای تعیین اسیدفولیک به دلیل حساسیت فلئورسانسی کم این ماده 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 هم غلظت با اسیدفولیک بود موردراندازه‌گیری قرار گرفت (شکل ۱). لذا ۱۰ میکرو لیتر نمونه استاندارد در محدوده غلظتی انتخاب و پس از تثبیت pH نمونه در حدود ۴ توسط ۱۴۰ میکرو لیتر بافر استات به غلظت ۰/۲ مولار، ۵۰ میکرو لیتر محلول پرمنگنات ۰/۱ مولار به نمونه موردنظر اضافه‌شده و نمونه به مدت ۱ دقیقه به هم زده شد و سپس ۴ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۶۰۰ دور بر دقیقه توسط شیکر هم زده‌شده تا در این دما واکنش تبدیل اسیدفولیک به فلئوروفور موردنظر به‌طور کامل صورت گیرد. حال با افزودن حدود ۵۰ میکرو لیتر محلول آب‌اکسیژنه ۰/۷۵ مولار مازاد پرمنگنات به منگنز (II) تبدیل‌شده و نمونه پس از ۳۰ ثانیه سونیکاسیون، آماده تزریق به دستگاه HPLC خواهد بود که حدود ۲۰ میکرو لیتر از این نمونه به دستگاه تزریق و توسط دتکتور فلورسانس آشکارسازی و اندازه‌گیری صورت گرفته است (۵).



شکل (۱): واکنش تبدیل اسیدفولیک به فلئوروفور موردراندازه‌گیری

برای استخراج نمونه‌های حقیقی هم مقدار ۵ گرم از نمونه آرد یا نان توزین شده و توسط محلول‌های استخراج‌کننده مختلف مورد استخراج قرار گرفت (این محلول‌ها شامل بافر فسفات با pHهای ۷ و ۹ و بافر تترابورات-تری کلرواستات با pH ۸/۵ بود) که درنهایت بهترین جواب با محلول بافر فسفات با pH حدود ۹ به دست آمد. لذا حدود ۵ گرم نمونه پس از افزودن حدود ۵۰ میلی‌لیتر از محلول استخراج‌کننده 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 محلول استخراج‌شده از فیلتر ۰/۴۵ میکرونی عبور داده شد و ۱۰ میکرو لیتر از نمونه استخراجی مشابه نمونه‌های استاندارد پس از تبدیل اسیدفولیک به فلئوروفور مربوطه اندازه‌گیری گردید (۴).

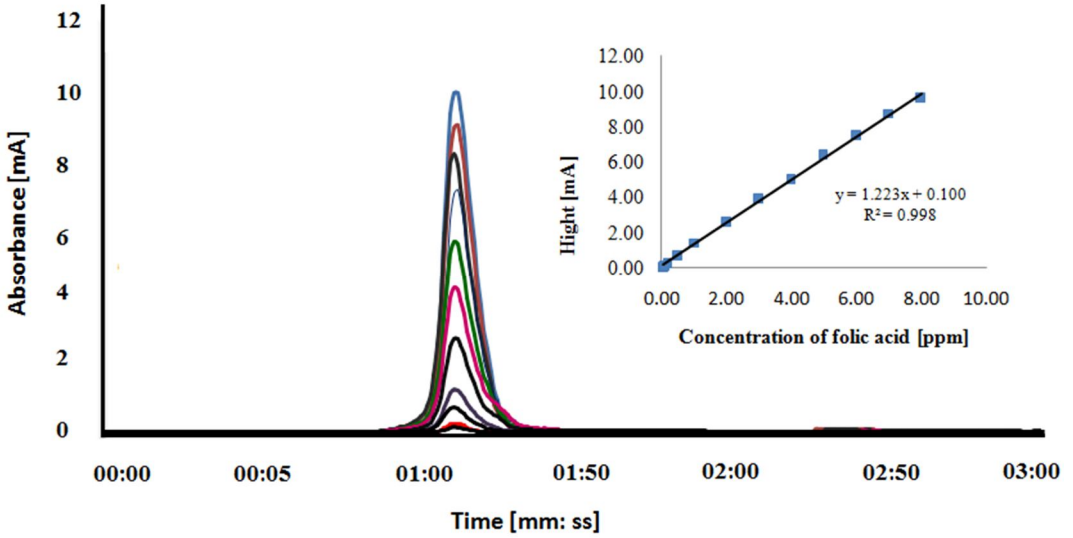
جهت تشخیص و اندازه‌گیری مقادیر اسیدفولیک از دتکتور فلورسانس با طول‌موج تحریکی۲۹۶ نانومتر (Excitation) و طول‌موج نشری ۴۴۰ نانومتر (Emission) استفاده گردید شرایط به‌کاررفته در دستگاه HPLC در جدول شماره (۱) آورده شده است.به‌عنوان فاز متحرک نیز مخلوطی از متانول و آب دیونیزه به نسبت ۲۰ به ۸۰ استفاده شد.

جدول (۱): شرایط آزمایشی بکار رفته با دستگاه HPLC

پارامتر	شرایط انتخابی
فاز ساکن	اکتا دسیل سیلان C18
طول ستون	۱۰ سانتی‌متر
فاز متحرک	متانل: آب دیونیزه (۲۰: ۸۰)
سرعت جریان فاز متحرک	۱ (یک) میلی‌لیتر بر دقیقه
دمای ستون	۵۰ درجه سانتی‌گراد
طول‌موج‌های جذب و نشر	طول‌موج جذبی ۲۹۶ نانومتر و طول‌موج نشری ۴۴۰ نانومتر
حجم نمونه تزریقی	۲۰ میکرو لیتر

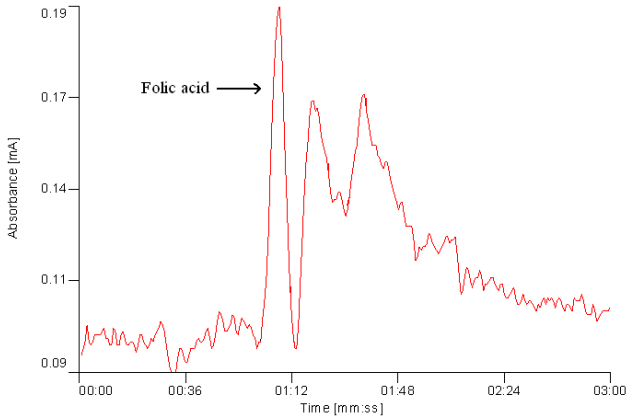
Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:11 +0330 on Friday February 23rd 2018

با تزریق غلظت‌های مختلف اسیدفولیک به سیستم، شدت پاسخ‌های متفاوتی نیز توسط آشکارساز حاصل گردید که با کمک داده‌های به‌دست‌آمده، یک منحنی استاندارد برحسب شدت پاسخ آشکارساز نسبت به غلظت‌های مختلف محلول استاندارد اسیدفولیک ترسیم گردید. 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. زمان بازداری[1] برای اسیدفولیک ۱/۰۷ دقیقه به دست آمد. مقدار ضریب همبستگی منحنی $R^2=0.998$ و معادله منحنی برابر $Y=1.223X+0.100$ حاصل شد. بنابراین با توجه به اندازه‌گیری‌های انجام‌گرفته در خصوص مقدار اسیدفولیک در نمونه‌های آرد و نان سایر کشورها این منحنی یک منحنی کاملاً ایدئال و قابل‌اطمینان جهت ارزیابی مقدار اسیدفولیک در انواع آرد و نان موجود در بازار ایران محسوب می‌شود (شکل ۲).



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

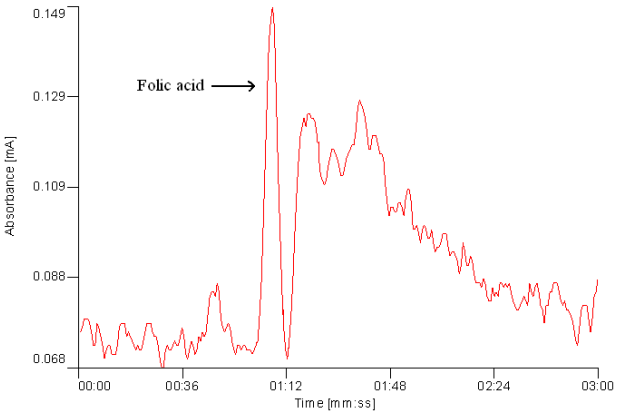
در شکل‌های ۳ و ۴ دو کروماتوگرام از دو نمونه آرد و نان به همراه پیک مربوط به اسیدفولیک در هر مورد آورده شده است. که امکان اندازه‌گیری دقیق اسیدفولیک را در نان و آرد با دقت بالا را نمایش می‌دهد.



شکل (۳): کروماتوگرام اسیدفولیک برای نمونه آرد

[1] Retention Time

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:11 +0330 on Friday February 23rd 2018



شکل (۴): کروماتوگرام اسیدفولیک برای نمونه نان

بررسی دقت و صحت روش اندازه‌گیری:

میزان دقت و صحت روش انتخاب‌شده با محاسبه دقت و صحت نتایج حاصل از آنالیز نمونه قابل ارزیابی می‌باشد. به این منظور میزان تغییرات Intra day و Inter day از طریق محاسبه مقدار انحراف استاندارد و ضریب واریانس موردبررسی قرار گرفت.

به‌منظور پایش تغییرات Inter day، ۳ غلظت متفاوت محلول استاندارد اسیدفولیک برحسب میلی‌گرم بر لیتر (ppm) موردبررسی قرار گرفتند و به‌منظور پایش تغییرات Intra day، ۳ غلظت مختلف از محلول استاندارد اسیدفولیک برحسب میلی‌گرم بر لیتر(ppm) با ۳ بار تکرار در ۳ روز متوالی موردبررسی قرار گرفت.

بررسی تغییرات Inter-day در نمونه حقیقی:

به‌منظور پایش تغییرات Inter-day در نمونه‌های حقیقی، ۵ نمونه آرد و ۵ نمونه نان به‌طور رندوم با سه تکرار برای هر نمونه در یک روز اندازه‌گیری شد و نتایج حاصل در جدول (۲) خلاصه شده است.

جدول (۲): 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

بررسی میزان استخراج اسیدفولیک:

به‌منظور بررسی درصد استخراج اسیدفولیک یک نمونه آرد و یک نمونه نان برداشته‌شده و به روش افزایش استاندارد درصد استخراج و اثر ماتریکس آرد و نان در فرایند استخراج اسیدفولیک موردبررسی قرار گرفت. این آزمایش‌ها سه بار بر روی هر نمونه انجام‌شده و نتایج زیر حاصل شد (جدول ۳). بررسی نتایج نشان‌دهنده استخراج حدود ۷۲ درصد در نمونه‌های آرد و نان را نشان می‌دهد، لذا در محاسبات مربوط به استخراج از نمونه‌های حقیقی بایستی این درصد استخراج اعمال گردد.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:11 +0330 on Friday February 23rd 2018

جدول (۳): 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

با توجه به جداول شـماره ۴ و ۵ و ۶ و ۷ نتایج حاصـل از این مطالعه به شرح زیر قابل‌ذکر می‌باشد:

در جدول ۴ نتایج حاصله نشان از یک کاهش ۱۶/۶۷ درصدی در میزان اسیدفولیک از مرحله تبدیل آرد به نان با اعمال حرارت پخت و عمل فرمانتاسیون می‌باشد که این مقدار کاهش در مقایسه با کاهش ۱۲-۲۱ درصدی گزارش‌شده در سایر مقالات هم‌خوانی دارد. این نتایج بیانگر میانگین ۱/۰۲ میکروگرم اسیدفولیک در هر گرم نمونه آرد و ۰/۸۵ میکروگرم در هر گرم نان می‌باشد (۳).

جدول (۴): نتایج حاصل از اندازه‌گیری اسیدفولیک در نمونه‌های آرد و نان جمع‌آوری‌شده از ۳۰ نانوایی شهر

ردیف	کارخانه تولیدی	میزان اسیدفولیک ($\mu g.g^{-1}$)	
		نمونه آرد	نمونه نان
۱	کارخانه آرد A	۰/۶۸	۰/۵۷
۲	کارخانه آرد A	۰/۵۵	۰/۵۶
۳	کارخانه آرد A	۰/۶۴	۰/۵۹
۴	کارخانه آرد A	۰/۲۸	۰/۴۷
۵	کارخانه آرد A	۰/۶۸	۰/۶۶
۶	کارخانه آرد A	۱/۰۹	۰/۸۹
۷	کارخانه آرد A	۰/۷۷	۰/۶۵
۸	کارخانه آرد A	۰/۸۴	۰/۷۰
۹	کارخانه آرد A	۰/۶۵	۰/۷۴
۱۰	کارخانه آرد A	۰/۴۶	۰/۴۱
	میانگین کارخانه آرد A	۰/۶۶	۰/۶۲
۱۱	کارخانه آرد B	۱/۰۹	۰/۸۸
۱۲	کارخانه آرد B	۰/۷۶	۰/۷۳
۱۳	کارخانه آرد B	۰/۷۷	۰/۶۶
۱۴	کارخانه آرد B	۰/۷۳	۰/۶۸
۱۵	کارخانه آرد B	۰/۹۴	۰/۴۶
۱۶	کارخانه آرد B	۰/۶۰	۰/۴۶
۱۷	کارخانه آرد B	۰/۵۶	۰/۶۲
۱۸	کارخانه آرد B	۰/۴۶	۰/۳۷
	میانگین کارخانه آرد B	۰/۷۴	۰/۶۱
۱۹	کارخانه آرد C	۲/۲۰	۰/۹۴
۲۰	کارخانه آرد C	۲/۰۸	۱/۵۳
۲۱	کارخانه آرد C	۱/۶۱	۱/۶۰

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:11 +0330 on Friday February 23rd 2018

ردیف	کارخانه تولیدی	میزان اسیدفولیک ($\mu g.g^{-1}$)	
		نمونه آرد	نمونه نان
۲۲	کارخانه آرد C	۰/۸۲	۰/۶۲
۲۳	کارخانه آرد C	۰/۹۲	۰/۹۲
۲۴	کارخانه آرد C	۰/۹۲	۰/۹۲
	میانگین کارخانه آرد C	۱/۴۲	۱/۰۹
۲۵	کارخانه آرد D	۱/۹۵	۱/۷۳
۲۶	کارخانه آرد D	۱/۷۸	۱/۷۸
۲۷	کارخانه آرد D	۱/۰۳	۱/۴۴
	میانگین کارخانه آرد D	۱/۵۹	۱/۶۵
۲۸	کارخانه آردE	۰/۷۸	۰/۷۸
۲۹	کارخانه آرد E	۱/۹۸	۱/۱۹
	میانگین کارخانه آرد E	۱/۳۸	۰/۹۵
۳۰	کارخانه آرد F	۱/۸۴	۱
	میانگین کل	۱/۰۲	۰/۸۵

جدول شماره ۵ نتایج مربوط به آرد ۵ کارخانه اصلی تولیدکننده آرد نانوائی‌های شهر ارومیه قبل از غنی‌سازی با پرمیکس را نشان می‌دهد. با توجه به جدول مشخص می‌گردد میزان اسیدفولیک قبل از غنی‌سازی ۱/۰۷ میکروگرم بر گرم بوده که پس از غنی‌سازی به ۲/۴۰ میکروگرم بر گرم رسیده است(لازم به یادآوری است غنی‌سازی در محل کارخانه و به هنگام نمونه‌برداری انجام گردید.) با در نظر گرفتن یک کاهش۱۶/۶۷ درصدی پس از مرحله پخت، نتیجه مورد انتظار ۲ میکروگرم در هر گرم نان (۲۰۰ میکروگرم در ۱۰۰ گرم آرد) برآورده گردید. درحالی‌که با مراجعه به نتایج جدول ۴ مشخص می‌گردد نتایج حاصله کمتر از نتیجه مورد انتظار ۲میکروگرم در هر گرم نمونه آرد یا نان می‌باشد که نشان از غنی نشدن آردهای مصرفی نانوائی‌ها با پرمیکس می‌باشد.

جدول (۵): اندازه‌گیری اسیدفولیک در آرد تهیه‌شده از کارخانه‌های آرد شهر قبل و بعد از غنی‌سازی با پرمیکس

ردیف	کارخانه تولیدکننده	میزان اسیدفولیک برحسب میکروگرم بر گرم ($\mu g.g^{-1}$)	
		آرد قبل از غنی‌سازی	آرد پس از غنی‌سازی
۱	کارخانه آرد A	۱/۱۸	۳/۱۹
۲	کارخانه آرد B	۱/۵۴	۱/۸۷
۳	کارخانه آرد C	۱/۰۶	۲/۱۳
۴	کارخانه آرد D	۰/۷۴	۲/۰۷
۵	کارخانه آرد E	۰/۸۳	۲/۷۲
	میانگین کارخانه‌ها	۱/۰۷	۲/۴۰

جدول ۶ توزیع مقادیر مختلف اسیدفولیک را در نمونه‌های آرد و نان نشان می‌دهد. با این نتیجه‌گیری که در حدود ۷۰ درصد نمونه‌های آرد ونان دارای مقادیر اسیدفولیک کمتر از ۱ میکروگرم در هر گرم نمونه (معادل ۱۰۰ میکروگرم در هر ۱۰۰ گرم نمونه) می‌باشد.

در جدول ۷ میزان اسیدفولیک در انواع آرد غلات موجود در بازار ایران ارائه‌شده است. در ضمن میزان فولات هم در این نوع

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:11 +0330 on Friday February 23rd 2018

غلات که از USDA (United States Department of Agriculture),(6) و FSANZ (Food Standards Australia New Zealand), (7) گزارش‌شده آورده شده که همخوانی خوبی مابین نتایج به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری و گزارش‌شده مشاهده می‌شود.

جدول (۶): محدوده تغییرات غلظت اسیدفولیک و درصد فراوانی هر نمونه در نمونه‌های آرد و نان جمع‌آوری‌شده از نانوایی‌ها

محدوده تغییرات غلظت ($\mu g.g^{-1}$)	تعداد و درصد هر نمونه	
	نمونه آرد	نمونه نان
۰/۲ – ۰/۵	۳ (٪ ۱۰)	۵ (٪ ۱۶/۶۷)
۰/۵ – ۱/۰	۱۷ (٪ ۵۶/۶۶)	۱۷ (٪ ۵۶/۶۶)
۱/۰ – ۱/۵	۳ (٪ ۱۰)	۳ (٪ ۱۰)
۱/۵ – ۲/۰	۵ (٪ ۱۶/۶۷)	۵ (٪ ۱۶/۶۷)
≥ ۲/۰	۲ (٪ ۶/۶۷)	۰ (٪ ۰)
جمع کل	۳۰ (٪ ۱۰۰)	۳۰ (٪ ۱۰۰)

جدول (۷): اندازه‌گیری میزان اسیدفولیک در نمونه‌های مختلف انواع آردهای موجود در بازار

نوع آرد	میزان اسیدفولیک (µg/ 100 g)		
	اندازه‌گیری شده	گزارش‌شده از USDA	گزارش‌شده از FSANZ
آرد برنج گل‌ها	۶		
آرد برنج غنچه	۶	۴	گزارش نشده
آرد برنج ترخینه	۱۹		
آرد سفید NC	۳۲	۴۴	۴۷
آرد سفید گل‌ها	۵۸		
آرد سوخاری گل‌ها	۸۸	۱۰۳	گزارش نشده
آرد سوخاری ترخینه	۱۰۰		
آرد قنادی ترخینه	۱۲۴	-	-
آرد ذرت گل‌ها	۸۸	۲۵	۱
آرد سیب‌زمینی گل‌ها	۷۶	۲۵	۳۰
آرد نخودچی گل‌ها	۱۱۲	۴۳۷	۱۸۰

بحث و نتیجه‌گیری

میزان اسیدفولیک میزان اسیدفولیک در سبد غذایی افراد در کشورهای مختلف متفاوت بوده و بر اساس شرایط و پارامترهای مختلف آن جامعه تعریف شده است. طرح غنی‌سازی آرد در سال‌های اخیر موردتوجه قرار گرفته است. این موضوع به‌قدری حائز اهمیت است که در سال ۱۹۹۸ میلادی در امریکا غنی‌سازی آرد با اسیدفولیک جهت برآورد نیاز خانواده‌ها به‌صورت متداول جز طرح‌های ملی و اجباری تبدیل گردیده است. علاوه بر آمریکا، اکثر کشورهای اروپائی نیز غنی‌سازی آردهای خود را با اسیدفولیک در سرلوحه اقدامات پیشگیرانه به‌منظور کاهش کم‌خونی‌ها و احتمال نقص لوله عصبی در دوران حاملگی قراردادند. برنامه غنی‌سازی مواد غذائی ازجمله آرد با اسیدفولیک در بیش از ۴۰ کشور جهان در حال حاضر اجباری گردیده است درحالی‌که فقط ۴ کشور نسبت به ارزیابی این موضوع اقدام نموده‌اند (۸،۹).

حال با ارائه گزارش شفافی از وضعیت آرد و نان‌های غنی‌سازی شده مورد مصرف، مصرف‌کنندگان و سایر منابع تأمین‌کننده این ویتامین، می‌توان در خصوص لزوم یا عدم لزوم غنی‌سازی و میزان غنی‌سازی در ایران بحث نمود.

با توجه به دلایل متقن مبنی بر اهمیت موضوع، مسئولین بهداشتی ایران برای اولین بار در سال ۱۳۸۰ برنامه غنی‌سازی آرد

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:11 +0330 on Friday February 23rd 2018

را با آهن و اسیدفولیک در استان بوشهر آغاز کردند. بر اساس توصیه سازمان بهداشت جهانی غنی‌سازی آرد با اسیدفولیک به مقدار ۱۵۰ میکروگرم بر ۱۰۰ گرم از آرد طی تصویب‌نامه شماره ۱۱۸۶۳/ت/۳۰۸۲۶ مورخه ۸۳/۴/۳ هیئت‌وزیران، دولت دستورالعمل غنی‌سازی آرد خبازی‌ها را به‌عنوان راهکار موضوع ابلاغ نمود. از سال ۱۳۸۶ طرح غنی‌سازی آردها با اسیدفولیک توسط کارخانه‌های آردسازی اجباری گردید. مسلماً درافزایش اسیدفولیک به آردها که درنهایت به‌صورت نان پخته‌شده توسط اقشار مختلف جامعه مصرف خواهد گردید، بایستی مقدار افزایش با نیاز واقعی مردم مطابقت داشته باشد.این مسئله به‌طور مستقیم با سبد غذائی مورد مصرف مردم ارتباط خواهد داشت.بنابراین دانستن محتویات سبد غذائی و مقادیر موجود اسیدفولیک در محتویات آن و سپس محاسبه مقدار نیاز واقعی به اسیدفولیک و بعد در نظر گرفتن مقدار افزایش می‌تواند یکی از چالش‌های مهم در پیش روی متخصصین تغذیه قرار بگیرد.

در ایران بر اساس قوانین وزارت بهداشت غنی‌سازی آرد با اسیدفولیک به ازای ۱۵۰ میکروگرم اسیدفولیک بر ۱۰۰ گرم از آرد تعیین گردیده است.این غنی‌سازی با افزایش مخلوط پرمیکس که محتوی آهن و اسیدفولیک می‌باشد صورت می‌گیرد.در کشور ایران بر اساس مطالعات مصرف مواد غذائی در خانوارهای شهری و روستایی، سرانه روزانه مصرف نان ۳۲۰ گرم تعیین شده است.بدین‌جهت نان به‌عنوان یک عامل غذائی مناسب برای غنی‌سازی با آهن و اسیدفولیک در نظر گرفته شده است (۱).

برای پایش منظم و مستمر انجام عمل غنی‌سازی آردهای نانوائی‌ها نیاز به طراحی روش اندازه‌گیری دقیق و قابل انجام در آزمایشگاه‌های کنترل بیشتر احساس می‌گردد. لذا ما بر این اساس تصمیم گرفتیم موضوع اندازه‌گیری اسیدفولیک را در آردهای غنی‌شده از منابع علمی جستجو و سپس از بین آن‌ها، آسان‌ترین و قابل‌اجرا بودن آزمایش را، راه‌اندازی بنماییم (۱۲-۱۰).

طبق نتایج حاصله از ۳۰ نمونه آرد نانوائی‌های شهر ارومیه مقدار متوسط اسیدفولیک در آن‌ها ۱۰۲ میکروگرم بر ۱۰۰ گرم از آرد می‌باشد. این مقدار نسبت به انتظار ما از غنی‌سازی برحسب محاسبات انجام‌شده یعنی ۱۵۰ میکروگرم بر ۱۰۰ گرم از آرد غنی‌شده کمتر می‌باشد. مقدار اسیدفولیک به‌دست‌آمده در مراجعه مستقیم به کارخانه‌های آردسازی ارومیه مقدار ۲۴۰ میکروگرم بر ۱۰۰ گرم از آرد را نشان می‌دهد و این مقدار در آردها قبل از غنی‌سازی مقدار ۱۰۷ میکروگرم بر ۱۰۰ گرم از آرد را نشان می‌دهد که با مقادیر آردهای نانوائی‌ها همخوانی دارد. این مسئله نشانگر این واقعیت است که آردهای توزیع یافته در نانوائی‌ها اکثراً پروسه غنی‌سازی را طی نمی‌نمایند.

مقدار اسیدفولیک در نان‌های پخته‌شده، ۸۵ میکروگرم بر ۱۰۰ گرم از نان را نشان می‌دهد. این مقدار، کاهش ۱۶/۶۷ درصدی را در طی پروسه فرمانتاسیون و حرارت پخت نشان می‌دهد. مقدار کاهش اسیدفولیک در مطالعه ما با مقادیر گزارش‌شده در منابع علمی که مقدار کاهش را ۲۲-۱۲ در صد گزارش نموده‌اند، مطابقت کاملاً خوبی را نشان می‌دهد(۳).

بر اساس نتایج حاصله از کاهش مقدار اسیدفولیک درنتیجه پروسه تهیه نان، آیا بهتر نیست ما مقدار کاهش اسیدفولیک را به‌صورت افزایشی به آردهای غنی‌شده اضافه بنماییم. به‌عنوان‌مثال بجای افزایش ۱۵۰ میکروگرم مقدار ۱۷۰ میکروگرم در طی مرحله غنی‌سازی اضافه نماییم که بعد از کاهش به مقدار موردنظر ما برسد.

نتایج این پروژه حاکی از مقدار اسیدفولیک کمتر از ۱۰۰ میکروگرم بر ۱۰۰ گرم از آردهای نانوائی‌ها می‌تواند ناشی از عدم هموژناسیون یکنواخت در آردها باشد که معمولاً مخلوط مقدار کم اسیدفولیک به‌صورت پودر با حجم زیاد آرد آن‌هم به‌صورت پودر در حالت‌جامد و درنهایت به دست آوردن مخلوط کاملاً یکسان و هموژن از دو فاز جامد کاری است بس دشوار و مشکل که البته باید توضیح بدهیم که کارخانه‌های آردسازی با استفاده از توربین‌های مکنده قوی این معضل را حل نموده‌اند.

توجیه بعدی در ارتباط با عدم موفقیت طرح فوق ممکن است درنتیجه عدم‌حمایت‌های مالی ارگان‌های دخیل در امر غنی‌سازی باشد که در این صورت کارخانه‌های آردسازی امکان ادامه طرح فوق را نخواهند داشت.

درنهایت وجود مقادیر متفاوت در مقدار اسیدفولیک شاید به دلیل کم‌اهمیت گرفتن موضوع توسط مسئولین کارخانه‌های آردسازی باشد و چون کنترل منظم و دقیق و عدم ارسال گزارش‌های پایش مو ضوع به اطلاع کارخانه‌های ر سانده نمی شود لذا در بسیاری از مواقع آن‌ها افزایش و غنی‌سازی را به فراموشی می سپارند و نتیجه امر تنها ۲۵ در صد از موفقیت غنی سازی را در نمونه‌های آرد نشان می‌دهد.

References:

1. Office of Community Nutrition Ministry of Health, Treatment and Medical Education, strategies to prevent micronutrient deficiency with emphasis on nutrient enrichment. Tehran: 2004. (Persian)
2. Breithaupt DE. Determination of folic acid by ion-pair RP-HPLC in vitamin-fortified fruit juices after

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:11 +0330 on Friday February 23rd 2018

solid-phase extraction. Food chemistry 2001;74(4):521–5.

3. Gujska E, Majewska K. Effect of baking process on added folic acid and endogenous folates stability in wheat and rye breads. Plant Foods Hum Nutr 2005;60(2):37–42.
4. Alaburda J, de Almeida AP, Shundo L, Ruvieri V, Sabino M. Determination of folic acid in fortified wheat flours. J food composition Anal 2008;21(4):336–42.
5. 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. Fresenius J Anal Chem 1993;346(6–9):841–6.
6. USDA (United States Department of Agriculture),. National Nutrient Database for Standard Reference, Agriculture Research Service, National Agriculture Library [Internet]. 2011 [cited 2016 Jun 11]. Available from: https://ndb.nal.usda.gov/
7. Food Standards Australia New Zealand [Internet]. 2006 [cited 2016 Jun 11]. Available from: http://www.foodstandards.gov.au/Pages/default.aspx
8. Abdollahi Z, Elmadfa I. Folate, vitamin B12 and homocysteine status in women of childbearing age: baseline data of folic acid wheat flour fortification in Iran. Ann Nutr Metab 2008; 53: 143-50.
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Trends in wheat-flour fortification with folic acid and iron--worldwide, 2004 and 2007. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2008;57(1):8–10.
10. Klaczkow G, Anuszewska E. The use of HPLC method for determination of the folic acid in multi-component vitamin preparations. Acta Pol Pharm 2000; 57: 257-60.
11. Póo-Prieto R, Haytowitz DB, Holden JM, Rogers G, Choumenkovitch SF, Jacques PF, et al. Use of the affinity/HPLC method for quantitative estimation of folic acid in enriched cereal-grain products. J Nutr 2006;136(12):3079–83.
12. Beecher GR, Doherty RF. Liquid chromatographic method for the measurement of food folates and folic acid. Faseb J 2000; 14; 293-7.

Original Article

DETERMINATION AND COMPARISON OF FOLIC ACID IN FORTIFIED WHEAT FLOURS AND BREADS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) IN THE URMIA CITY

Amir Heydari [1], Mohammad Reza Vardast[2], Samal Yeganeh Zare[3], Nahid Afrang[4], Samira Fahimi[5]*

Received: 1 Mar, 2016; Accepted: 1 May, 2016

Abstract

Background & Aims: Folate has been identified as one of the most important water-soluble B vitamins for normal metabolic function and it is essential for normal human cell division and cell growth. Since humans cannot synthesize folates, they must obtain 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 the reasonable price and availability. The objective of this study was to describe a method for determination of folic acid in wheat flours and breads.

Materials & Methods: The method consisted of several procedures, including an extraction technique, oxidation of folic acid to increase fluorescent properties, and a modified HPLC with fluorescence detection method. Thirty enriched flours and thirty bread samples were purchased from the local baker markets in Urmia.

Results: The standard curve for folic acid passed through the origin and was liner over the range 0.1-8 µg/L. The peak of folic acid appeared as sharp with retention times of 1.12 minutes. 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 detection 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.

Conclusion: This work is a preferred method for folic acid analysis because it is rugged, fast, specific and sensitive. Estimation of folic acid in wheat flour was less than those based on calculations as done for enriched flours. There was 17% decrease of folic acid from flour to bread stage.

Keywords: Folic acid, Fortified wheat flours, High Performance Liquid Chromatography

Address: Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Urmia University of Medical Science, Urmia, Iran
Tel: +98 44 3275 4991
Email: heydari.866@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2016: 27(3): 197 ISSN: 1027-3727

[1] *Associate Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Urmia University of Medical Science, Urmia, Iran (Corresponding Author)*
[2] *Assistant Professor, Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Urmia University of Medical Science, Urmia, Iran*
[3] *Food and Beverages Safety Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[4] *Food and Beverages Safety Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*
[5] *Food and Beverages Safety Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 12:11 +0330 on Friday February 23rd 2018