

اندازه‌گیری فولیک اسید در مواد غذایی با استفاده از زیست حسگری بر پایه اسیدهای نوکلئیک دورشته‌ای

لیلا میرمقتدایی¹، نوشین میرزا نصیری²، مهدی کدیور³

1- نویسنده مسئول: دکترای علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: Le_mirmoghtradaie@yahoo.com

2- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد شیمی، دانشکده شیمی، دانشگاه تهران، ایران

3- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: 92/6/2

تاریخ پذیرش: 92/10/4

چکیده

سابقه و هدف: فولات یکی از مهم‌ترین ویتامین‌هایی است که نقش مهمی در سوخت‌وساز بدن انسان ایفا می‌کنند. تاکنون روش‌هایی مانند کروماتوگرافی، طیف‌بینی و روش‌های میکروبی برای تشخیص فولیک اسید گزارش شده‌اند، که اغلب این روش‌ها به علت نیاز به روش‌های استخراج و خالص سازی مقدماتی هزینه‌بر و زمان‌بر بوده و یا تحت تأثیر مزاحمت عوامل مداخله‌گر قرار می‌گیرند. روش‌های الکتروشیمیایی، روش‌های ساده و ارزانی هستند که به مقادیر بسیار کمی نمونه برای تجزیه نیاز دارند. زیست حسگرها دارای انتخابگری بالاتری نسبت به سایر حسگرها هستند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه برای اندازه‌گیری سریع فولیک اسید از الکتروود مغز مداد اصلاح شده با داکسی ریبونوکلیک‌اسید به‌دست آمده از اسپرم ماهی سالمون استفاده گردید. ابتدا pH محلول، غلظت داکسی ریبونوکلیک‌اسید، زمان و پتانسیل تثبیت در سه سطح با استفاده از روش RSM بهینه‌سازی شد. در مرحله دوم، اتصال فولیک اسید با داکسی ریبونوکلیک‌اسید تثبیت شده روی الکتروود مغز مداد با دنبال کردن پیام جریان باز آلی آدنین، بررسی گردید. در نهایت این حسگر برای اندازه‌گیری فولیک اسید در نمونه‌های واقعی مانند قرص فولیک اسید، آرد گندم و اسفناج مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: شرایط بهینه شامل pH معادل 4/8، غلظت داکسی ریبونوکلیک‌اسید 24 میکروگرم بر میلی‌لیتر، پتانسیل تثبیت 0/7 ولت و زمان اعمال پتانسیل معادل 304 ثانیه به‌دست آمد که با استفاده از این متغیرها، پیام جریان 3/04 میکروآمپر ایجاد شد. با استفاده از این زیست حسگر، غلظت اسیدفولیک در دامنه 1 تا 10 میکرومول دارای رابطه خطی با پیام جریان بود و حدتشخیص $1/06 \times 10^{-8}$ به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: استفاده از زیست‌حسگر بر پایه DNA دارای حساسیت، دقت و سرعت بالایی در اندازه‌گیری غلظت فولیک اسید در مواد مورد بررسی بود.

واژگان کلیدی: فولیک اسید، الکتروشیمیایی، زیست‌حسگر، داکسی ریبونوکلیک‌اسید، انتخاب‌گری

• مقدمه

روده کوچک توسط آنزیم تترا هیدروفولات دهیدروژناز به شکل فعال زیستی تتراهیدروفولات تبدیل می‌شود (2، 3). اندازه‌گیری این ترکیب با استفاده از روش‌های مختلفی مانند کروماتوگرافی گازی با آشکارساز جرمی (GC-MS)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکارساز جرمی (HPLC-MS)، کروماتوگرافی مایع با

فولیک اسید ترکیبی متعلق به خانواده ویتامین‌های محلول در آب گروه B است که در کبد و کلیه حیوانات، قارچ‌ها و جلبک‌ها و در گیاهانی مانند غلات و حبوبات و گیاهان دارای برگ سبز مانند اسفناج و بامیه وجود داشته و ماده مهمی برای حفظ فعالیت و سلامتی موجودات زنده رشد و تقسیم سلول‌های بدن است (1). فولیک اسید در

اندازه‌گیری فولیک اسید استفاده کرد که حدتشخیص آن 10^{-8} بود (12). سپس وان و یانگ در سال 2002 استفاده از الکتروده طلائی اصلاح شده با مرکاپتو بنزوتیازول را بررسی کردند که حد تشخیص آن 4×10^{-9} به‌دست آمد (13). در سال 2006 الکترودی پوشیده شده از فسفو مولیبدیک و پلی پیرول توسط گو و همکاران بررسی شد (14). در این تحقیق از زیست حسگری بر پایه داکسی ریبونوکلیتیک اسید به منظور افزایش انتخاب‌گری حسگر با استفاده از روش‌های الکتروشیمیایی شامل روش‌های ولتامتری چرخه‌ای و ولتامتری پالس تفاضلی به منظور اندازه‌گیری فولیک اسید در مواد غذایی استفاده گردیده است.

• مواد و روش‌ها

الکتروده تمیز شده داخل بافر استات (pH=4.8) 0/5 مولار حاوی 20 میکرومولار NaCl، در پتانسیل 1/8 ولت نسبت به الکتروده مرجع نقره/کلور نقره فعال سازی می‌شود. الکتروده فعال سازی شده، داخل بافر استات حاوی مقادیر مختلف داکسی ریبونوکلیتیک اسید قرار داده شد و اختلاف پتانسیل 0/5 ولت نسبت به الکتروده مرجع نقره/کلور نقره به مدت زمان مناسب اعمال شد. برای بررسی نشست DNA روی سطح الکتروده، پس از تثبیت داکسی ریبونوکلیتیک اسید روی سطح الکتروده، سطح با لایه‌ای از طلا پوشانده شده، آماده روبش توسط دستگاه SEM می‌شود.

الکتروده تعدیل شده داخل بافر استات قرار داده شده و دامنه پتانسیل از 0/4 تا 1/4 با دامنه پالس و سرعت روبش مناسب اعمال می‌شود. به این ترتیب پیک‌های مربوط به اکسایش آدنین و گوانین به دست می‌آید. برای بررسی تقابل داکسی ریبونوکلیتیک اسید و ماده مورد نظر، الکتروده تعدیل شده با داکسی ریبونوکلیتیک اسید را به مدت 90 ثانیه در محلول بافر استات حاوی مقادیر مختلف ماده مورد نظر قرار داده، سپس الکتروده را شست‌وشو داده و در داخل بافر استات تحت پتانسیل 0/4 تا 1/4 با دامنه پالس و سرعت روبش مناسب قرار داده شد. اثر پارامترهایی مانند pH در دامنه 4/2 تا 5/3، غلظت داکسی ریبونوکلیتیک اسید در دامنه 4 تا 36 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)، زمان تثبیت 50 تا 550 ثانیه و پتانسیل تثبیت 0/2 تا 0/6 ولت روی شدت پیام الکتریکی آدنین مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز نتایج در چهار بخش تجزیه واریانس و مدل‌سازی فرآیند، رسم نمودارهای رویه پاسخ سه بعدی، تعیین شرایط بهینه برای حصول بهترین نمونه و در نهایت پیش‌بینی مقادیر متغیرهای هدف در شرایط بهینه به کمک

آشکارساز جرمی (LC-MS)، طیف‌بینی جرمی - یونی (Ion Mass Spectroscopy)، الیزا (ELISA)، الکتروفورز موئینه (Capillary Electrophoresis)، روش فلوریتری، روش رنگ سنجی و روش‌های میکروبی (1) انجام شده است، که در کل نیازمند روش‌های استخراج و خالص سازی بسیار طولانی بوده و انجام آنها، مستلزم صرف زمان نسبتاً زیادی است. به‌کارگیری روش‌های کروماتوگرافی مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نیز هزینه‌بر بوده و اغلب نیازمند انجام پیش تیمارهای متعدد، آماده سازی نمونه بوده (4) و در ضمن باید توسط افراد متخصص انجام شوند (5). با در نظر گرفتن این محدودیت‌ها، نیاز به روش‌های جایگزین که سریع‌تر و دقیق‌تر بوده و برای انجام آن‌ها نیاز به آماده سازی نمونه نباشد، احساس می‌شود (4). الکتروشیمی تجزیه‌ای نقش مهمی در اندازه‌گیری ترکیبات مفید و مضر موجود در مواد غذایی و محیط زیست ایفا می‌کند (6). به طور خاص، حسگرها و زیست حسگرهای الکتروشیمیایی اهمیت زیادی در پایش برخط (on line) مواد مختلف دارند (7). حسگرها وسایلی هستند که پدیده قابل تشخیص را به پیام قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کنند (8). در سال‌های اخیر استفاده از اسیدهای نوکلیتیک به عنوان ابزاری در تشخیص و کنترل بسیاری از ترکیبات مورد اندازه‌گیری، افزایش یافته است. ترکیبات به دام افتاده در داخل داکسی ریبونوکلیتیک اسید در صورتی که الکتروفعال باشند، به صورت مستقیم و یا با تغییر در پیام‌های الکتروشیمیایی داکسی ریبونوکلیتیک اسید شناسایی می‌شوند. به علاوه این زیست حسگرها در تشخیص توالی‌های انتخابی الیگونوکلیتوتیدها مورد استفاده قرار می‌گیرند (9). سامانه‌های تشخیصی استفاده کننده از داکسی ریبونوکلیتیک اسید کم‌هزینه و سبک بوده و به راحتی قابل استفاده هستند و امکان کوچک کردن آن‌ها بدون تغییر در میزان دقت و حساسیتشان وجود دارد (10). استفاده از داکسی ریبونوکلیتیک اسید بلند زنجیر دوارشته‌ای مناسب‌تر از تک‌رشته‌ای بوده و استفاده از آن برای اندازه‌گیری تکرارپذیری و حساسیت بیشتری نسبت به داکسی ریبونوکلیتیک اسید تک‌رشته‌ای ایجاد می‌کند (11).

تاکنون فولیک اسید به روش‌های مختلفی به‌صورت الکتروشیمیایی اندازه‌گیری شده است که بعضاً دقت کافی نداشته و گاهی اختصاصی نبوده است که در زیر به برخی از آنها اشاره می‌شود. ابوالمعالی در سال 1992 از الکتروده خمیر کربن اصلاح شده با پالمیتیک و استئاریک به منظور

سطح الکتروود مغز مداد قبل و بعد از تثبیت داکسی ریبونوکلئیک اسید توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفت که تصاویر به دست آمده در شکل 1 آمده است.

مدل سازی: به منظور به حداکثر رساندن پیام جریان و در حقیقت به حداکثر رساندن میزان داکسی ریبونوکلئیک اسید تثبیت شده روی سطح الکتروود، فاکتورهای مانند pH، غلظت داکسی ریبونوکلئیک اسید، زمان اعمال پتانسیل و پتانسیلی که عمل تثبیت در آن اتفاق می افتد، با استفاده از برنامه آماری رویه سطح پاسخ بهینه سازی گردید و مدل مربوطه به دست آمد. مدل ریاضی که بزرگی پیام آدنین را به عنوان تابعی از پارامترهای غیروابسته نشان می دهد، در معادله 1 آمده است.

$$(1) \quad Y = 1.56 + 0.06X_1 + 0.15X_2 + 0.08X_3 + 0.16X_4 - 0.03X_1^2 - 0.02X_2^2 - 0.02X_3^2 + 0.03X_4^2$$

پارامترهای مختلف معادله در جدول 1 آمده است.

در مرحله بعدی پس از تعیین مدل، برای دستیابی به سطوحی از متغیرهای مستقل که در نتیجه به کارگیری آنها بهترین محصول از واکنش به دست خواهد آمد، بهینه سازی انجام می شود. به منظور بهینه سازی باید سطح پایین و بالا و سطح مطلوب و مورد نظر برای هر یک از فاکتورهای هدف تعیین شود. لذا نرم افزار بر اساس مدل توصیفی و همچنین سطوح تعیین شده، ترکیبی از متغیرها را تعیین می کند که نتیجه آن بهترین محصول است.

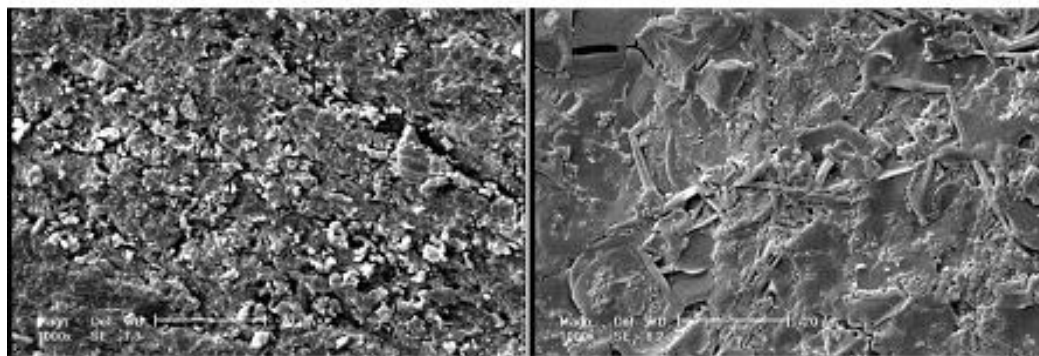
نرم افزار آماری مینی تب (Minitab 14) انجام گرفت. در مرحله بعد اثر مزاحمت ها روی پاسخ زیست حسگر نسبت به غلظت 1×10^{-6} از فولیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. برای استخراج فولیک اسید از نمونه های مختلف از روش های متفاوتی استفاده می شود.

الف - قرص فولیک اسید: یک عدد قرص 5 میلی گرمی پودر شده و داخل بالن 100 میلی لیتری حاوی 60 میلی لیتر محلول سود 0/1 نرمال ریخته به مدت 15 دقیقه توسط همزن مغناطیسی همزده شد. سپس محلول توسط صافی میلی پور 0/2 میکرون صاف شده، توسط محلول سود 0/1 نرمال به حجم رسانده شد.

ب - آرد گندم غنی سازی شده و اسفناج: عصاره فولیک اسید استخراجی از آرد گندم غنی سازی شده از مخلوط کردن 100 گرم آرد و 100 گرم اسفناج با 1000 میلی لیتر محلول سود 0/1 نرمال تهیه شد. سپس مخلوط حاصل در 12000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی توسط صافی میلی پور 0/2 میکرون صاف شده و به عنوان عصاره نمونه آرد مورد استفاده قرار گرفت (13).

• یافته ها

بررسی تثبیت داکسی ریبونوکلئیک اسید پس از اعمال پتانسیل در بافر استات حاوی داکسی ریبونوکلئیک اسید: برای تأیید تثبیت داکسی ریبونوکلئیک اسید پس از اعمال پتانسیل 0/7 ولت در بافر استات حاوی غلظت 20 µg/ml از داکسی ریبونوکلئیک اسید،



شکل 1. تصاویر میکروسکوپ الکترونی (الف) قبل و (ب) بعد از تثبیت DNA

جدول 1. متغیرهای مستقل و تعیین حدود آن با استفاده از طرح مرکب مرکزی

محدوده و سطح					علائم	متغیرهای مستقل
-2	-1	0	1	2		
4/2	4/5	4/8	5/1	5/4	X ₁	pH
4	12	20	28	36	X ₂	غلظت داکسی ریبونوکلیک اسید
50	175	300	425	550	X ₃	زمان تثبیت
0/3	0/4	0/5	0/6	0/7	X ₄	پتانسیل تثبیت

محدوده 4 تا 36 میلی گرم بر لیتر منتقل شد. الکتروود به مدت‌های مختلف 50 تا 550 ثانیه تحت پتانسیل‌های مختلف 0/30+ تا 0/70+ نسبت به الکتروود مرجع نقره/کلرور نقره قرار گرفت و محلول با سرعت 200 دور بر دقیقه هم زده شد. انتخاب ترکیب پارامترهای مختلف در هر مرتبه آزمایش، طبق جدول 2 انجام شد.

برای بهینه‌سازی پارامترهای مختلف الکتروود در سل الکتروشیمیایی حاوی 10/0 میلی لیتر بافر استاتی 0/5 مولار (pH=4/8) قرار گرفت و پتانسیل 1/8+ ولت نسبت به الکتروود مرجع نقره/کلرور نقره به مدت 300 ثانیه به الکتروود اعمال گردید. سپس الکتروود با بافر استاتی شسته شد و به سلول الکتروشیمیایی حاوی 10/0 میلی لیتر بافر استاتی (pH=4/8) و مقادیر مختلف داکسی ریبونوکلیک اسید دو رشته‌ای در

جدول 2. طرح آزمایشی استفاده شده و مقادیر به دست آمده از آزمایش و مقادیر پیش‌بینی شده توسط RSM

ردیف	کدهای مربوط به متغیرهای غیروابسته				مقادیر پیش‌بینی شده	مقادیر به دست آمده از آزمایش
	X ₄	X ₃	X ₂	X ₁		
1	0	0	0	2	1/56	1/40
2	-1	-1	1	1	1/49	1/32
3	-1	-1	-1	1	1/19	0/77
4	0	0	0	-2	1/32	0/81
5	1	1	-1	-1	1/55	1/34
6	1	-1	-1	1	1/51	1/34
7	0	0	0	0	1/56	1/56
8	0	0	0	0	1/56	1/62
9	0	-2	0	0	1/32	0/63
10	0	0	0	0	1/56	1/54
11	1	-1	1	1	1/81	1/89
12	0	0	-2	0	1/18	0/57
13	1	1	-1	1	1/67	1/44
14	-1	1	1	1	1/97	2/11
15	-1	1	1	-1	1/53	1/20
16	0	0	0	0	1/56	1/57
17	-1	-1	-1	-1	1/37	1/12
18	0	0	2	0	1/78	2/04
19	-1	-1	-1	-1	1/07	0/65
20	1	1	1	1	1/65	1/81
21	0	0	0	0	1/56	1/56
22	0	0	0	0	1/56	1/54
23	0	0	0	0	1/56	1/59
24	1	1	1	-1	1/85	1/83
25	2	0	0	0	2/50	3/19
26	-1	1	-1	-1	1/23	0/70
27	-2	0	0	0	1/36	1/35
28	0	2	0	0	1/87	1/87
29	-1	1	-1	1	1/35	1/15
30	1	-1	1	-1	1/69	1/85
31	1	-1	-1	-1	1/39	1/28

ای به دست آمد. در نهایت بیشینه حاصل توسط نرم افزار GPRS با استفاده از فیلتر ساوتیزکی-گولار با پهنای 0/01 ولت تصحیح زمینه شد و جریان اکسایش بازهای گوانین و آدنین داکسی ریبونوکلیک اسید دو رشته‌ای ثبت گردید و با مقادیر به دست آمده از پیش‌بینی مدل مقایسه گردید. در جدول 3 تجزیه واریانس داده‌ها و خطاها آمده است و $p < 0/001$ نشان‌دهنده معنی‌دار بودن مدل است.

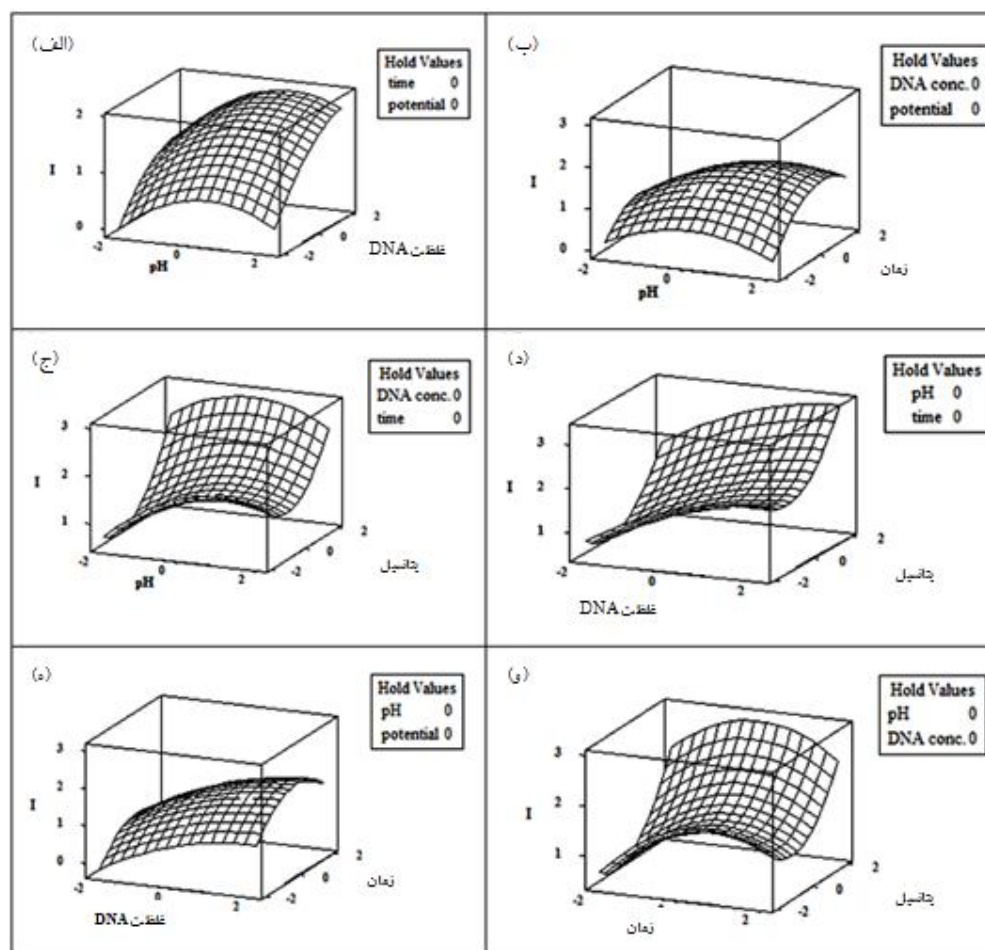
سپس الکتروود با بافر استات شسته شد و به سلول الکتروشیمیایی حاوی بافر استات منتقل شد و روبش پتانسیل در محدوده 0/40 تا +1/40 با پتانسیل مرحله‌ای (Step potential) 0/00495 و مدولاسیون دامنه (Modulation amplitude) 0/1 ولت و سرعت روبش 50 میلی‌ولت بر ثانیه انجام گرفت. بدین ترتیب بیشینه اکسایش بازهای آدنین و گوانین داکسی ریبونوکلیک اسید دو رشته

جدول 3. آنالیز واریانس داده‌ها (ANOVA) برای تطابق دادن داده‌های به دست آمده با مدل رویه پاسخ

P value	F value	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	
0/00 ^a	15/03	0/56	7/79	14	رگرسیون
0/00 ^a	39/41	1/49	5/97	4	خطی
0/00 ^a	12/18	0/46	1/84	4	درجه دوم
0/67 ^{ns}	0/68	0/02	0/15	6	حاصلضرب
—	—	0/03	0/6	16	خطای باقیمانده
—	—	—	8/58	30	کل

^{ns}: غیر معنی‌دار در $p > 0/5$

^a: معنی‌دار در $p < 0/001$



شکل 2. منحنی‌ها، سه بعدی، به دست آمده از مدل، سه به سه پاسخ

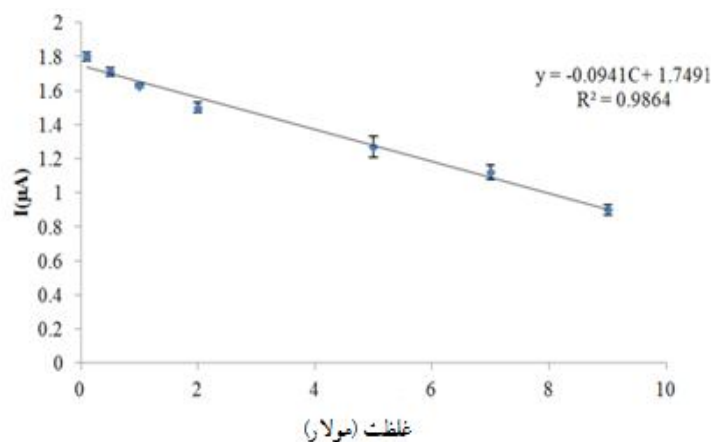
فیلتر ساوتیزکی-گولار با پهنای پیک 0/01 ولت ثبت گردید (شکل 3).

بررسی اثر مزاحمت‌های احتمالی: قبل از بررسی کارایی روش در اندازه‌گیری نمونه حقیقی، اثر مزاحمت مواد مختلف در آنالیز فولیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که مواد شیمیایی که بر اساس ساختار یا دامنه پتانسیل اکسیداسیون-احیا احتمال ایجاد مزاحمت در اندازه‌گیری فولیک اسید می نمایند، به محلول حاوی 1/0 میکرومولار فولیک اسید افزوده شدند و سپس با استفاده از الکترومداد اصلاح شده با داکسی ریبونوکلیک اسید دو رشته‌ای و روش ارائه شده، شدت پیام تجزیه‌ای آن‌ها محاسبه گردید (جدول 5).

اندازه‌گیری فولیک اسید در نمونه‌های واقعی: برای بررسی کارایی زیست‌حسگر ساخته شده در اندازه‌گیری میزان فولیک اسید در نمونه‌های واقعی، قرص فولیک اسید (1 میلی گرم)، آرد گندم غنی‌سازی شده و اسفناج مورد بررسی قرار گرفت (جدول 6).

بهینه‌سازی شرایط در حین تثبیت داکسی ریبونوکلیک اسید روی سطح الکترومد در جدول 4 نشان داده شده است

رسم منحنی استاندارد: الکترومد مغز مداد اصلاح شده با داکسی ریبونوکلیک اسید دو رشته‌ای در شرایط بهینه (غلظت 24/0 میلی گرم بر لیتر داکسی ریبونوکلیک اسید دو رشته‌ای و زمان تغلیظ 0/70+ ولت) تهیه شد. سپس الکترومد مغز مداد اصلاح شده با داکسی ریبونوکلیک اسید دو رشته‌ای به مدت 7 دقیقه در محلول بافر تریس 0/1 مولار دارای pH=8/5 حاوی مقادیر مختلف فولیک اسید قرار گرفت. محلول در سرعت 200 دور در دقیقه هم زده شد. الکترومد به سلول الکتروشیمیایی حاوی 10/0 میلی لیتر محلول بافر استاتی 0/5 مولار دارای pH= 4/8 منتقل شد و ولتامتری پالس تفاضلی پتانسیل مرحله‌ای 0/00495 و مدولاسیون دامنه 0/1 ولت و سرعت روبش 50 میلی‌ولت بر ثانیه در محدوده 0/40+ تا 1/40+ ولت نسبت به الکترومد مرجع نقره/کلورور نقره انجام گرفت. پیام‌های ولتامتری پالس تفاضلی (DPV) پس از تصحیح زمینه با



شکل 3. بررسی منحنی کالیبراسیون فولیک اسید از طریق دنبال کردن پیام آدنین

جدول 4. مقادیر بهینه‌سازی شده توسط مدل برای فاکتورهای مختلف

فاکتور	pH	غلظت داکسی ریبونوکلیک اسید (μg/ml)	مدت زمان تثبیت (ثانیه)	پتانسیل تثبیت (ولت)
مقدار بهینه‌سازی شده	4/8	24	304	0/7

جدول 5. بررسی اثر مزاحمت‌های احتمالی در اندازه‌گیری 1/0 میکرومولار فولیک اسید توسط الکتروود مغزمداد اصلاح شده با داکسی ریبونوکلیک اسید

گونه‌های مورد بررسی	حد مجاز غلظت گونه به غلظت فولیک اسید
ویتامین‌های ب1، ب2، ب3 و ب6، نیکوتین آمید و تانیک اسید	500
گلوکز، ساکارز، اسید آسکوربیک، هیستیدین، سیستئین، لیزین و تربیتوفان	1000

جدول 6. اندازه‌گیری اسیدفولیک در نمونه‌های واقعی با استفاده از زیست‌حسگر بهینه‌سازی شده

نمونه واقعی	شماره	غلظت استاندارد افزوده شده	غلظت اندازه‌گیری شده (μmol)	درصد بازیابی
قرص اسیدفولیک (5mg)	1	0	1/08	-
	2	3	4/06	99/0
	3	4	5/02	98/4
آرد گندم غنی‌سازی شده	1	0	0/40	-
	2	3	3/43	100/8
	3	4	4/37	99/3
اسفناج	1	0	0/25	-
	2	3	3/18	97/8
	3	4	4/28	100/0

• بحث

بررسی سطح الکتروود قبل و بعد از تثبیت DNA توسط SEM نشان می‌دهد پس از اعمال پتانسیل رشته‌های داکسی ریبونوکلیک اسید روی سطح دیده می‌شوند. این تصاویر با تصاویر به‌دست آمده در تحقیق موتی و همکاران که در سال 2012 انجام شده است، مطابقت دارد (15).

برای بررسی اثر متقابل هر دو متغیر بر روی فاکتور هدف مورد نظر، نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی آنها رسم می‌شود. در شکل 2 قسمت (الف) دیده می‌شود که در pH‌های پایین و بالاتر از 4/8 میزان پیام کاهش می‌یابد. اسیدهای نوکلئیک حاوی بازهای آلی گوانین و آدنین می‌باشند که در pH‌های اسیدی روی الکتروود مغزمداد اکسید می‌شوند. همچنین در این نمودار دیده می‌شود که افزایش غلظت داکسی ریبونوکلیک اسید باعث افزایش پیام جریان شده است. این امر به‌علت حضور مقدار بیشتری داکسی ریبونوکلیک اسید در دسترس الکتروود بوده که در نتیجه مقدار بیشتری داکسی ریبونوکلیک اسید روی سطح الکتروود می‌نشیند. این نتایج با نتایج به‌دست آمده از مطالعه دوگان توپال و ازکان در سال 2011 متفاوت است. در این مطالعه نشان داده شده است که افزایش غلظت داکسی ریبونوکلیک

اسید تا 2 $\mu\text{g/mL}$ موجب افزایش پیام شده، ولی پس از آن نمودار صاف شده و با افزایش غلظت دیگر جریان افزایش نیافته است (16). این تفاوت به‌علت تفاوت سطح مقطع الکتروود در این تحقیق (قطر 2 mm) در مقایسه با مطالعه آن ها (0/7mm) است. علت دیگر استفاده از پتانسیل فعال‌سازی (1/4V) و زمان اعمال آن به‌مدت کوتاه‌تر (60s) در مطالعه دوگان توپال و ازکان است.

در قسمت (ب) شکل 2 تأثیر همزمان pH و زمان روی نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی پیام جریان نشان داده شده است. در این قسمت غلظت داکسی ریبونوکلیک اسید و پتانسیل روی حد وسط یعنی غلظت 24 $\mu\text{g/mL}$ و پتانسیل 0/5 ولت ثابت نگه داشته شد. در این نمودار هم، بررسی pH نشان می‌دهد که بزرگترین پیام در pH حدود 4/8 به‌دست می‌آید. افزایش زمان تا حدود 400 ثانیه موجب افزایش پیام شده، ولی پس از آن منجر به کاهش جریان می‌شود که می‌تواند به‌علت اثر تخریبی اعمال پتانسیل بالا به مدت طولانی بر الکتروود مغزمداد و در نتیجه جدا شدن تدریجی داکسی ریبونوکلیک اسید از روی سطح باشد که باعث کاهش در پیام دریافتی از باز آلی آدنین می‌شود. در این نمودار بهترین

بیش از $3\mu\text{A}$ به دست آید. مطلوب است پارامترها به نحوی تنظیم شوند که این جریان در کمترین غلظت داکسی ربیونوکلئیک اسید و کمترین زمان به دست آید. محدودیتی در مورد pH و پتانسیل وجود ندارد، بنابراین این دو فاکتور در سطحی قرار می‌گیرد که بیشترین پیام ایجاد شود و بعد غلظت داکسی ربیونوکلئیک اسید و زمان کاهش داده می‌شود تا حدی که جریان کمتر از $3\mu\text{A}$ نشود. با این توضیحات، مقادیر بهینه‌سازی شده فاکتورهای مختلف در جدول 4 آمده است. برای تأیید صحت شرایط تعیین شده باید آزمایشی در این شرایط انجام داده و نتایج آن را با نتایج پیش بینی شده توسط نرم افزار مقایسه کرد. چنانچه اختلاف معنی‌داری بین نتایج واقعی و پیش بینی شده وجود نداشته باشد، مدل توصیفی تأیید شده و قابل استفاده برای دیگر شرایط مورد نظر است. با استفاده از این مقادیر جریان $3\mu\text{A}$ به دست آمد که تفاوت معنی‌داری با مقدار پیش‌بینی شده توسط مدل ندارد ($p > 0/05$).

شکل 3 میزان کاهش در پیام اکسایش آدنین در حضور فولیک اسید را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، فولیک اسید در دامنه غلظت 0/1 تا 10 میکرومولار دارای رابطه خطی با میزان کاهش پیام است. معادله خط به دست آمده از دنبال کردن کاهش پیام آدنین در محدوده غلظت 0/1 تا 10 میکرومولار فولیک اسید عبارتست از:

$$I(\mu\text{A}) = -0.0941C + 1.7491, R^2 = 0.9864, n = 7$$

نتایج حاصل از بررسی دقت روش اندازه‌گیری فولیک اسید از طریق دنبال کردن تغییرات کاهش پیام آدنین در غلظت 2/0 و 5/0 میکرومولار فولیک اسید پس از ده بار اندازه‌گیری است که به ترتیب معادل 4/6 و 4/3 درصد می‌باشد که نشان‌دهنده تکرارپذیری بالای این حسگر می‌باشد. حد تشخیص روش بر اساس رابطه $3S_b/m$ از روی منحنی استاندارد در ناحیه غلظتی 0/1 تا 10 میکرومولار فولیک اسید برابر با $1/06 \times 10^{-8}$ میکرومولار به دست آمد. انحراف استاندارد شاهد (S_b) از طریق دنبال کردن پیام آدنین در عدم حضور فولیک اسید حاصل می‌شود.

در بررسی اثر مزاحمت‌ها، گونه‌هایی که شدت پیام در حضور آن‌ها در محدوده 3 درصد پیام تجزیه‌ای باشد به عنوان غیر مزاحم در نظر گرفته شده، ولی در صورت ایجاد مزاحمت، غلظت گونه مزاحم کاهش داده می‌شود تا حد

پیام در $\text{pH} = 4/8$ و زمان حدود 400 ثانیه به دست آمده است.

در قسمت (ج) بررسی پتانسیل تثبیت نشان می‌دهد که افزایش این پتانسیل موجب افزایش شدیدی در پیام جریان حتی در pH های کمتر و بالاتر از 4/8 شده است. اعمال پتانسیل در خلال تثبیت داکسی ربیونوکلئیک اسید باعث افزایش نشست داکسی ربیونوکلئیک اسید روی سطح الکتروود می‌شود که به علت افزایش برهمکنش الکتروستاتیک بین بار مثبت ایجاد شده روی سطح و بار منفی گروه‌های فسفات داکسی ربیونوکلئیک اسید است (17). از آنجایی که با افزایش پتانسیل به 0/7 ولت احتمالاً بار مثبت بیشتری روی سطح ایجاد می‌شود، برهمکنش الکتروستاتیک با داکسی ربیونوکلئیک اسید افزایش می‌یابد.

در قسمت (د) تأثیر تغییرات همزمان غلظت داکسی ربیونوکلئیک اسید و پتانسیل بر پیام جریان در pH و زمان تثبیت ثابت نگه‌داشته شده در 4/8 و 300 ثانیه بررسی می‌شود. همان‌طور که قبلاً گفته شد افزایش غلظت داکسی ربیونوکلئیک اسید و پتانسیل هر کدام به تنهایی موجب افزایش میزان پیام می‌شود. در این شکل دیده می‌شود که حتی غلظت‌های کم نیز در پتانسیل بالا به میزان بیشتری برای مثال در مقایسه با بیشترین غلظت داکسی ربیونوکلئیک اسید، اما در پتانسیل کم روی سطح الکتروود می‌نشینند و بهترین پیام در بیشترین غلظت بالا و بیشترین میزان پتانسیل به دست می‌آید.

در قسمت (ه) شکل 2 اثر همزمان تغییرات غلظت داکسی ربیونوکلئیک اسید و زمان بر پیام جریان در pH ثابت 4/8 و پتانسیل ثابت 0/5 ولت بررسی شده است. این شکل نشان دهنده افزایش جریان در اثر افزایش غلظت داکسی ربیونوکلئیک اسید است که با افزایش زمان تا 400 ثانیه افزایش می‌یابد.

در قسمت (و) اثر تغییرات همزمان زمان و پتانسیل تثبیت بر پیام جریان در pH و غلظت داکسی ربیونوکلئیک اسید ثابت بررسی می‌شود. در این نمودار هم دیده می‌شود که اثر پتانسیل غالب بوده و افزایش پتانسیل می‌تواند کاهش پیام در اثر طولانی شدن زمان تثبیت را جبران کند که همان‌طور که گفته شد به علت افزایش تقابل الکتروستاتیک بین داکسی ربیونوکلئیک اسید و سطح الکتروود است.

برای بهینه‌سازی پارامترهای مختلف، شرایط باید به نحوی بهینه شود که میزان پیام جریان پیش‌بینی شده توسط مدل

سهولت استفاده به علت عدم نیاز به پیش تیمار مقدماتی و حساسیت، انتخابگری و تکرارپذیری بالا است. در این مطالعه از رشته‌های دوتایی داکسی ریبونوکلیک اسید که به روش الکتروشیمیایی روی سطح الکتروود مغز مداد رسوب داده شده بودند، برای اندازه‌گیری فولیک اسید به صورت غیرمستقیم استفاده گردید. با استفاده از این حسگر جریان در دامنه غلظت 0/1 تا 10 میکرومول از فولیک اسید دارای رابطه خطی با غلظت بوده و حد تشخیص این زیست حسگر $1/06 \times 10^{-8}$ به دست آمد.

مزاحمت آن تعیین گردد. جدول 5 نتایج حاصل از بررسی مزاحمت‌های احتمالی اندازه‌گیری فولیک اسید را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که روش ارائه شده دارای گزینش‌پذیری بسیار بالایی در اندازه‌گیری فولیک اسید است. غلظت فولیک اسید در 10 میلی‌لیتر از عصاره به دست آمده از نمونه‌های واقعی با استفاده از روش افزودن استاندارد اندازه‌گیری شد، که نتایج در جدول 6 آمده است. زیست حسگرهای برپایه داکسی ریبونوکلیک اسید که در ساخت آن‌ها از مغزمداد به عنوان الکتروود استفاده می‌شود، دارای مزایایی مانند ممانعت از آلودگی با نمونه‌های قبلی،

References

- Jiang X, Li R, Li J, He X. Electrochemical Behavior and Analytical Determination of Folic Acid on Carbon Nanotube Modified Electrode. *Russ J Electro chem* 2009; 45: 772-7.
- Bandžuchová L, Šteľesovská R, Navrátil T, Chýl'ková J. Electrochemical behavior of folic acid on mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode. *Electrochim Acta* 2011;56: 2411-19.
- Wang C, Li C, Ting L, Xu X, Wang C. Application of a Single-Wall Carbon Nano-Tube Film Electrode to the Determination of Trace Amounts of Folic Acid. *Microchim Acta* 2005; 152: 233-8.
- Trivedi UB, Lakshminarayana D, Kothari IL, Patel PB, Panchal CJ. Amperometric fructose biosensor based on fructose dehydrogenase enzyme. *Sens. Actuators B: Chemical* 2009; 136: 45-51.
- Viswanathan S, Radecki J. Nanomaterials in electrochemical biosensor for food analysis-A review. *Pol J Food Nutr Sci* 2008; 58: 157-64.
- Wang J, Rogers K. *Electrochemical Sensors for Environmental Monitoring: a Review of Recent Technology*. Las Vegas, Nev: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Monitoring and Support Laboratory. 1995.
- Cunningham A J. *Introduction to Bioanalytical Sensor*. John Wiley and Sons, Inc, New York. 1998.
- Ambrosi A. *The Application of Nanomaterials in Electrochemical Sensors and Biosensors*. School of Chemical Sciences, Dublin City University. 2007.
- Mascini M, Palchetti I, Marrazza G. DNA electrochemical biosensors. *Fresenius J Anall Chem* 2001; 369:15-22.
- Gao Z, Tensil N. A DNA biosensor based on the electrocatalytic oxidation of amine by a threading intercalator. *Anal Chim Acta* 2009;636:77-82.
- Mehrvar M, Abdi M. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. *Anal Sci* 2004; 20:1113-1125.
- Abo El-Maali N. Carbon paste electrodes modified with palmitic acid and stearic acid for the determination of folic acid (vitamin B₉) in both aqueous and biological media. *Bioelectro chem Bioenergetic* 1992; 27:365-473.
- Wan Q, Yang N. The direct electrochemistry of folic acid at a 2-mercaptobenzothiazole self-assembled gold electrode. *J Electroanal Chem* 2002; 527: 131-36.
- Guo HX, Li YQ, Fan LF, Wu XQ, Guo MD. Voltammetric behavior study of folic acid at phosphomolybdic-polypyrrole film modified electrode. *Electrochim Acta* 2006; 51: 6230-37.
- Muti M, Erdema A, Karagözlerb AE, Soysalb M. 5-Amino-2-mercapto 1,3,4-thiadiazole modified single-use sensors for electrochemical DNA analysis. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 2012; 93:116-120.
- Dogan-Topal S, Ozkan A. Electrochemical determination of anticancer drug fulvestrant at dsDNA modified pencil graphite electrode. *Electrochim Acta* 2011; 56:4433-38.
- Sassolas A, Leca-Bouvier BD, Blum LJ. DNA biosensors and microarrays. *Chem Rev* 2008; 108(1): 109-39.

Determining folic acid content of food using a double strand nucleic acid biosensor

Mirmoghtadaie L^{*1}, Mirza nasiri N², Kadivar M³

1- Corresponding author: Ph.D. in Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, E-mail: Le_mirmoghtadaie@yahoo.com

2- M.Sc in Chemistry, Center of Excellence in Electrochemistry, Faculty of Chemistry, University of Tehran, Tehran, Iran

3- Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Received 24 Aug, 2013

Accepted 25 Dec, 2013

Background and Objectives: Folate is essential to cell division and growth. Folic acid is commonly measured using HPLC-MS, spectroscopy, ELISA, and microbial methods that are cost-intensive and time-consuming because they require long extraction and purification times. It is known that electrochemical methods are simple and inexpensive and that analytical techniques require a small sample size. Biosensors also have higher selectivity than other sensors.

Materials and Methods: The present study proposes an electrochemical DNA biosensor as a screening device for rapid analysis of folic acid using a pencil graphite electrode modified with salmon sperm ds-DNA. Solution pH, DNA concentration, time of DNA deposition, and potential deposition were optimized using RSM. The binding of folic acid to DNA immobilized on a pencil graphite electrode was then measured using variations in the electrochemical signal of adenine. This biosensor was successfully used to measure folic acid in real samples, such as flour and spinach.

Results: The optimum values for the reaction were pH of 4.8, DNA concentration of $24 \mu\text{g mL}^{-1}$, deposition time of 304 s, and deposition potential of 0.60 V, which produced an adenine signal of $3.04 \mu\text{A}$. The folic acid concentration showed a linear correlation with the adenine signal current at $0.1\text{--}10.0 \mu\text{M L}^{-1}$ with a detection limit of $1.06 \times 10^{-8} \mu\text{M L}^{-1}$.

Conclusions: The results showed that the DNA-based biosensor showed high sensitivity, selectivity, and speed of folic acid determination.

Keywords: Folic acid, Electrochemical, Biosensor, DNA, Selectivity