مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هشتم، شماره 4، زمستان 1392، صفحات 198-189

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

لیلا میرمقتدایی[1]، نوشین میرزا نصیری [2]، مهدی کدیور[3]

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_mirmoghtadaie@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 الکترود مغز مداد اصلاح شده با داکسی ریبونوکلئیک‌اسید به‌دست آمده از اسپرم ماهی سالمون استفاده گردید. ابتدا pH محلول، غلظت داکسی ریبونوکلئیک اسید، زمان و پتانسیل تثبیت در سه سطح با استفاده از روش RSM بهینه‌سازی شد. در مرحله دوم، اتصال فولیک اسید با داکسی ریبونوکلئیک اسید تثبیت شده روی الکترود 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 ریبونوکلئیک اسید 24 میکروگرم بر میلی‌لیتر، پتانسیل تثبیت 0/7ولت 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 $1/06*10^{-8}$ 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 ریبونوکلئیک‌اسید، انتخاب‌گری

• مقدمه

فولیک اسید ترکیبی متعلق به خانواده ویتامین‌های محلول در آب گروه ب 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 روده کوچک توسط آنزیم تترا هیدروفولات دهیدروژناز به شکل فعال زیستی تتراهیدروفولات تبدیل می‌شود (3، 2). 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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

آشکارساز جرمی (LC-MS)، طیف‌بینی جرمی- یونی (Ion Mass Spectroscopy)، الیزا (ELISA)، الکتروفورز موئینه (Capillary Electrophoresis)، روش فلوریمتری، 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 روش های 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 دقیق‌تربوده 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 سال های اخیر استفاده از اسیدهای نوکلئیک به عنوان ابزاری در تشخیص و کنترل بسیاری از ترکیبات مورد اندازه‌گیری، افزایش یافته است. ترکیبات به دام افتاده در داخل داکسی ریبونوکلئیک اسید در صورتی‌که الکتروفعال باشند، به صورت مستقیم و یا با تغییر در پیام‌های الکتروشیمیایی داکسی ریبونوکلئیک اسید شناسایی می‌شوند. به علاوه این زیست حسگرها در تشخیص توالی‌های انتخابی الیگونوکلئوتیدها مورد استفاده قرار می‌گیرند (9). سامانه‌های تشخیصی استفاده کننده از داکسی ریبونوکلئیک 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 ریبونوکلئیک اسید بلند زنجیر دورشته‌ای مناسب‌تر از تک‌رشته‌ای بوده و استفاده از آن برای اندازه گیری تکرارپذیری و حساسیت بیشتری نسبت به داکسی ریبونوکلئیک 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 می شود. ابوالمعالی در سال 1992 از الکترود خمیر کربن اصلاح شده با پالمتیک و استئاریک به منظور اندازه گیری فولیک اسید استفاده کرد که حدتشخیص آن 10^{-8} بود (12). سپس وان و یانگ در سال 2002 استفاده از الکترود طلای 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 ریبونوکلئیک 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

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

الکترود 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 ریبونوکلئیک اسید و ماده مورد نظر، الکترود تعدیل شده با داکسی ریبونوکلئیک اسید را به مدت 90 ثانیه در محلول بافر استات حاوی مقادیر مختلف ماده مورد نظر قرار داده، سپس الکترود 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 ریبونوکلئیک اسید در دامنه 4 تا 36 ($\mu g\ mL^{-1}$)، 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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

نرم‌افزار آماری مینی‌تب (Minitab 14) انجام گرفت. در مرحله بعد اثر مزاحمت‌ها روی پاسخ زیست‌حسگر نسبت به غلظت 1×10^{-6} از فولیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. برای استخراج فولیک اسید از نمونه‌های مختلف از روش‌های متفاوتی استفاده می‌شود .

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

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

• یافته‌ها

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 20µg/ml از داکسی ریبونوکلئیک اسید، سطح الکترود مغز مداد قبل و بعد از تثبیت داکسی ریبونوکلئیک اسید توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفت که تصاویر به‌دست آمده در شکل 1 آمده است.

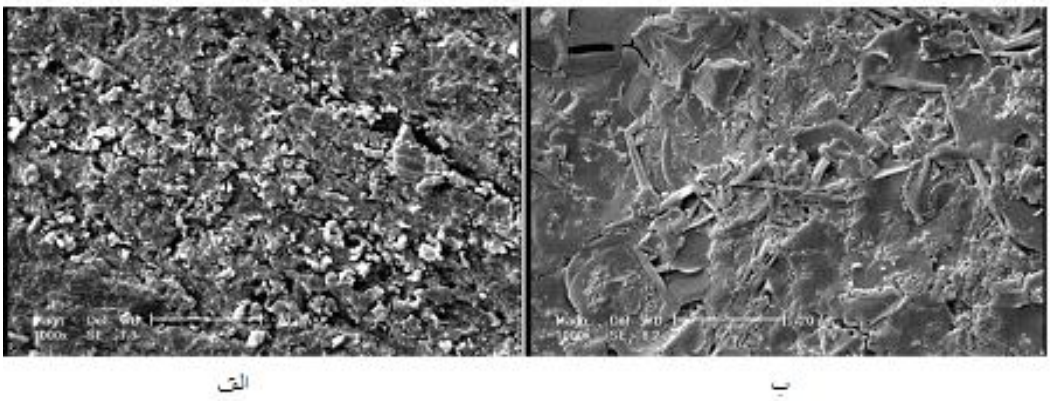
مدل‌سازی: به منظور به حداکثر رساندن پیام جریان و در حقیقت به حداکثر رساندن میزان داکسی ریبونوکلئیک اسید تثبیت شده روی سطح الکترود، فاکتورهایی مانند pH، غلظت داکسی ریبونوکلئیک اسید، زمان اعمال پتانسیل و پتانسیلی که عمل تثبیت در آن اتفاق می‌افتد، با استفاده از برنامه آماری رویه سطح پاسخ بهینه‌سازی گردید و مدل مربوطه به‌دست آمد. مدل ریاضی که بزرگی پیام آدنین را به عنوان تابعی از پارامترهای غیروابسته نشان می‌دهد، در معادله 1 آمده است.

(1)

$$Y = 1.56 + 0.06X_1 + 0.15X_2 + 0.08X_3 + 0.16X_4 - 0.03X_1^2 - 0.02X_2^2 - 0.02X_3^2 + 0.03X_4^2$$

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 می‌شود. به منظور بهینه‌سازی 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 می‌کند که نتیجه آن بهترین محصول است.



الف ب

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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

جدول1. متغیرهای مستقل و تعیین حدود آن با استفاده از طرح مرکب مرکزی

متغیرهای مستقل	علائم	محدوده و سطح				
		2	1	0	-1	-2
pH	X_1	5/4	5/1	4/8	4/5	4/2
غلظت داکسی ریبونوکلئیک اسید	X_2	36	28	20	12	4
زمان تثبیت	X_3	550	425	300	175	50
پتانسیل تثبیت	X_4	0/7	0/6	0/5	0/4	0/3

برای بهینه‌سازی پارامترهای مختلف الکترود در سل الکتروشیمیایی حاوی 10/0 میلی‌لیتر بافر استاتی 0/5 مولار (pH=4/8) قرار گرفت و پتانسیل 1/8+ ولت نسبت به الکترود مرجع نقره/کلرور نقره به مدت 300 ثانیه به الکترود اعمال گردید. سپس الکترود با بافر استاتی شسته شد و به سلول الکتروشیمیایی حاوی 10/0 میلی‌لیتر بافر استاتی (pH=4/8) و مقادیر مختلف داکسی ریبونوکلئیک اسید دو رشته‌ای در محدوده 4 تا 36 میلی‌گرم بر لیتر منتقل شد. الکترود به مدت‌های مختلف 50 تا 550 ثانیه تحت پتانسیل‌های مختلف 0/30+ تا 0/70+ نسبت به الکترود 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.

جدول2. طرح آزمایشی استفاده شده و مقادیر به‌دست آمده از آزمایش و مقادیر پیش‌بینی شده توسط RSM

ردیف	کدهای مربوط به متغیرهای غیروابسته				مقادیر پیش‌بینی شده	مقادیر به‌دست آمده از آزمایش
	X_1	X_2	X_3	X_4		
1	2	0	0	0	1/56	1/40
2	1	1	-1	-1	1/49	1/32
3	1	-1	-1	-1	1/19	0/77
4	-2	0	0	0	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	0	-2	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	-2	0	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	2	0	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	0	0	0	2	2/50	3/19
26	-1	-1	1	-1	1/23	0/70
27	0	0	0	-2	1/36	1/35
28	0	0	2	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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

سپس الکترود با بافراستات 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) 0/00495و 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 ریبونوکلئیک اسید دورشته 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 ریبونوکلئیک اسید دو رشته‌ای ثبت گردید و با مقادیر به‌دست آمده از پیش‌بینی مدل مقایسه گردید.

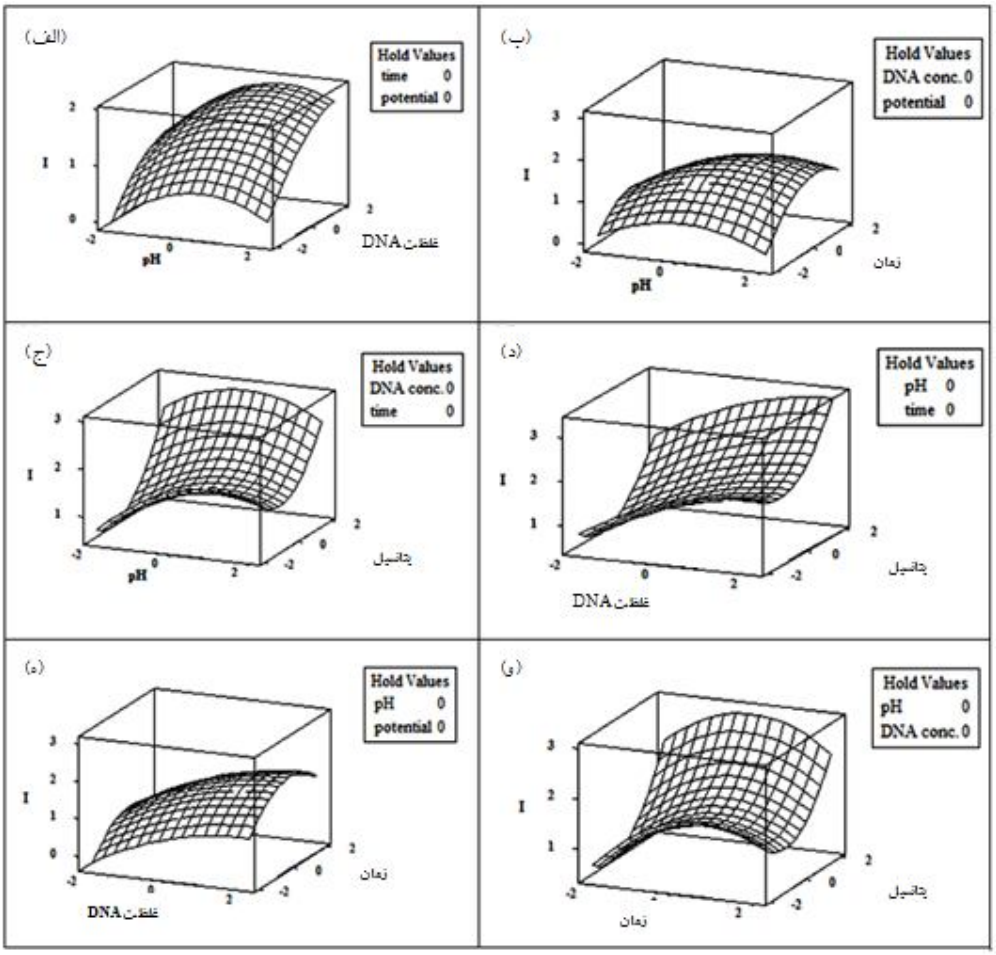
در جدول 3 تجزیه واریانس داده‌ها و خطاها آمده است و $p<0/001$ نشان‌دهنده معنی‌دار بودن مدل است.

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

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

[ns]: غیر معنی‌دار در $p>0/5$

[a]: معنی دار در $p<0/001$



شکل 2. منحنی های سه بعدی به‌دست آمده از مدل رویه پاسخ

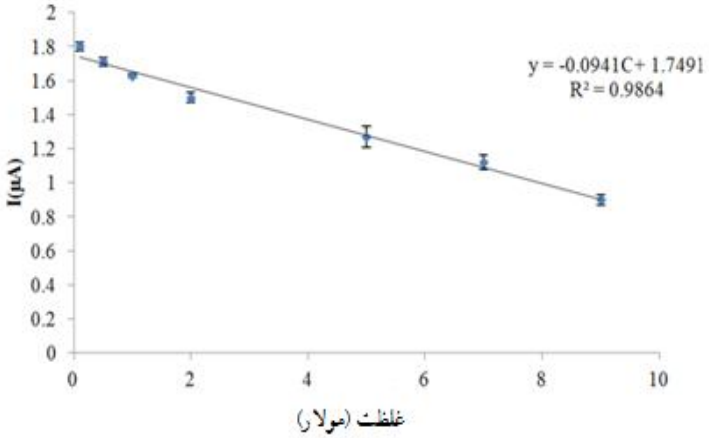
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

بهینه‌سازی شرایط در حین تثبیت داکسی ریبونوکلئیک اسید روی سطح الکترود در جدول 4 نشان داده شده است

رسم منحنی استاندارد: الکترود مغز مداد اصلاح شده با داکسی ریبونوکلئیک اسید دو رشته‌ای در شرایط بهینه (غلظت 24/0 میلی گرم بر لیتر داکسی ریبونوکلئیک اسید دو رشته‌ای و زمان تغلیظ داکسی ریبونوکلئیک اسید دو رشته‌ای 304 ثانیه و پتانسیل تغلیظ 0/70+ ولت) تهیه شد. سپس الکترود مغز مداد اصلاح شده با داکسی ریبونوکلئیک 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. الکترود 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 0/00495و مدولاسیون دامنه 0/1 ولت و سرعت روبش 50 میلی‌ولت بر ثانیه در محدوده 0/40+ تا 1/40+ ولت نسبت به الکترود مرجع نقره/کلرور نقره انجام گرفت. پیام‌های ولتامتری پالس تفاضلی (DPV) پس از تصحیح زمینه با فیلتر ساوتیزکی-گولار با پهنای پیک 0/01 ولت ثبت گردید (شکل 3).

بررسی اثر مزاحمت‌های احتمالی: قبل از بررسی کارآیی 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 الکترود مغز مداد اصلاح شده با داکسی ریبونوکلئیک 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 (1میلی‌گرم)، آرد گندم غنی‌سازی شده و اسفناج مورد بررسی قرار گرفت(جدول 6) .



شکل3. 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 ریبونوکلئیک اسید (µg/ml)	مدت زمان تثبیت (ثانیه)	پتانسیل تثبیت (ولت)
مقدار بهینه‌سازی شده	4/8	24	304	0/7

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

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

گونه‌های مورد بررسی	حد مجاز غلظت گونه به غلظت فولیک اسید
ویتامین‌های ب1، ب2، ب3 و ب6، نیکوتین‌آمید و تانیک اسید	500
گلوکز، ساکارز، اسید آسکوربیک، هیستیدین، سیستئین، لیزین و تریپتوفان	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
	1	0	1/08	–
قرص اسیدفولیک (5mg)	2	3	4/06	99/0
	3	4	5/02	98/4
	1	0	0/40	–
آرد گندم غنی‌سازی شده	2	3	3/43	100/8
	3	4	4/37	99/3
	1	0	0/25	–
اسفناج	2	3	3/18	97/8
	3	4	4/28	100/0

• بحث

بررسی سطح الکترود قبل و بعد از تثبیت DNA توسط SEM نشان می‌دهد پس از اعمال پتانسیل رشته‌های داکسی ریبونوکلئیک 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 می شود. 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 الکترود مغز مداد اکسید می‌شوند. همچنین در این نمودار دیده می‌شود که افزایش غلظت داکسی ریبونوکلئیک اسید باعث افزایش پیام جریان شده است. این امر به‌علت حضور مقدار بیشتری داکسی ریبونوکلئیک اسید در دسترس الکترود بوده که در نتیجه مقدار بیشتری داکسی ریبونوکلئیک اسید روی سطح الکترود 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 ریبونوکلئیک اسید تا 2µ 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 الکترود در این تحقیق (قطر2 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 ریبونوکلئیک اسید و پتانسیل روی حد وسط یعنی غلظت 24 µg/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 می تواند به‌علت اثر تخریبی اعمال پتانسیل بالا به مدت طولانی بر الکترود مغزمداد و در نتیجه جدا شدن تدریجی داکسی ریبونوکلئیک اسید از روی سطح باشد که باعث کاهش در پیام دریافتی از باز آلی آدنین می‌شود. در این نمودار بهترین

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

پیام در pH=4/8 و زمان حدود 400 ثانیه به‌دست 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 ریبونوکلئیک اسید باعث افزایش نشستن داکسی ریبونوکلئیک اسید روی سطح الکترود می‌شود که به‌علت افزایش برهمکنش الکتروستاتیک بین بار مثبت ایجاد شده روی سطح و بار منفی گروه‌های فسفات داکسی ریبونوکلئیک 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 ریبونوکلئیک اسید افزایش می‌یابد.

در قسمت (د) تأثیر تغییرات همزمان غلظت داکسی ریبونوکلئیک اسید و پتانسیل بر پیام جریان در pH و زمان تثبیت ثابت نگه‌داشته شده در 4/8 و 300 ثانیه بررسی می شود. همان‌طور که قبلا گفته شد افزایش غلظت داکسی ریبونوکلئیک اسید و پتانسیل هر کدام به‌تنهایی 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 ریبونوکلئیک اسید، اما در پتانسیل کم روی سطح الکترود می‌نشینند و بهترین پیام در بیشترین غلظت بالا و بیشترین میزان پتانسیل به‌دست می‌آید.

در قسمت (ه) شکل 2 اثر همزمان تغییرات غلظت داکسی ریبونوکلئیک 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 ریبونوکلئیک 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 ریبونوکلئیک اسید ثابت بررسی می‌شود. در این نمودار هم دیده می‌شود که اثر پتانسیل غالب بوده و افزایش پتانسیل می‌تواند کاهش پیام در اثر طولانی‌شدن زمان تثبیت را جبران کند که همان طورکه گفته شد به علت افزایش تقابل الکتروستاتیک بین داکسی ریبونوکلئیک اسید و سطح الکترود است.

برای بهینه‌سازی پارامترهای مختلف، شرایط باید به‌نحوی بهینه شود که میزان پیام جریان پیش‌بینی شده توسط مدل بیش از 3μA به‌دست آید. مطلوب است پارامترها به‌نحوی تنظیم شوند که این جریان در کمترین غلظت داکسی ریبونوکلئیک اسید و کمترین زمان به‌دست 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 ریبونوکلئیک اسید و زمان کاهش داده می‌شود تا حدی که جریان کمتر از 3μA 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 μA به‌دست 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 10میکرومولار دارای رابطه خطی با میزان کاهش پیام است.

معادله خط به‌دست آمده از دنبال کردن کاهش پیام آدنین در محدوده غلظت 0/1 تا 10میکرومولار فولیک اسید عبارتست از:

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

نتایج حاصل از بررسی دقت روش اندازه گیری فولیک اسید از طریق دنبال کردن تغییرات کاهش پیام آدنین در غلظت 2/0 و 5/0 میکرومولار فولیک اسید پس از ده بار اندازه گیری است که به‌ترتیب 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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

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 به‌دست آمده از نمونه‌های واقعی با استفاده از روش افزودن استاندارد اندازه گیری شد، که نتایج در جدول 6 آمده است.

زیست‌حسگرهای برپایه داکسی ریبونوکلئیک اسید که در ساخت آن‌ها از مغزمداد به‌عنوان الکترود استفاده می‌شود، دارای مزایایی مانند ممانعت از آلودگی با نمونه‌های قبلی، سهولت استفاده به‌علت عدم نیاز به پیش‌تیمار مقدماتی و حساسیت، انتخابگری و تکرارپذیری بالا است. در این مطالعه از رشته‌های دوتایی داکسی ریبونوکلئیک اسید که به روش الکتروشیمیایی روی سطح الکترود مغز مداد رسوب داده شده بودند، برای اندازه‌گیری فولیک اسید به‌صورت 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 زیست‌حسگر $1/06\times10^{-8}$ به‌دست آمد.

• References

1. 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.

2. Bandˇzuchová L, Sˇelesˇovská R, Navrátil T, Chyˊlková J. Electrochemical behavior of folic acid on mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode. Electrochim Acta 2011;56: 2411–19.

3. 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.

4. 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.

5. Viswanathan S, Radecki J. Nanomaterials in electrochemical biosensor for food analysis-A review. Pol J Food Nutr Sci 2008; 58: 157-64.

6. 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.

7. Cunningham A J. Introduction to Bioanalytical Sensor. John Wiley and Sons, Inc, New York. 1998.

8. Ambrosi A. The Application of Nanomaterials in Electrochemical Sensors and Biosensors. School of Chemical Sciences, Dublin City University. 2007.

9. Mascini M, Palchetti I, Marrazza G. DNA electrochemical biosensors. Fresenius J Anall Chem 2001; 369:15-22.

10. 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.

11. Mehrvar M, Abdi M. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. Anal Sci 2004; 20:1113- 1125.

12. Abo El-Maali N. Carbon paste electrodes modified with palmitic acid and stearic acid for the determination of folic acid (vitamin B_9) in both aqueous and biological media. Bioelectro chem Bioenergetic 1992; 27:365-473.

13. 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.

14. 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.

15. Muti M, Erdema A, Karagözlerb AE, Soysalb M. 5-Amino-2-mercapto 1,3,4-thidiazole modified single-use sensors for electrochemical DNA analysis. Colloids Surf. B: Biointerfaces 2012; 93:116-120.

16. Dogan-Topal S, Ozkan A. Electrochemical determination of anticancer drug fulvestrant at dsDNA modified pencil graphite electrode. Electrochim Acta 2011; 56:4433-38.

17. Sassolas A, Leca-Bouvier BD, Blum LJ. DNA biosensors and microarrays. Chem Rev 2008; 108(1): 109-39.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]

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

Mirmoghtadaie L[1] , Mirza nasiri N[2], Kadivar M[3]*

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 μg mL^{-1}, deposition time of 304 s, and deposition potential of 0.60 V, which produced an adenine signal of 3.04 μA. The folic acid concentration showed a linear correlation with the adenine signal current at 0.1–10.0 μM L^{-1} with a detection limit of 1.06×10^{-8} μM 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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-07]