استخراج و اندازه‌گیری فولیک اسید در نان غنی‌شده

محمد فرجی

کرج، پژوهشگاه استاندارد، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، گروه مواد غذایی، صندوق پستی ۱۳۹ ـ ۳۱۷۴۵

ابراهیم آزادنیا، کیانوش خسروی دارانی*+

تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، گروه تحقیقات صنایع غذایی، صندوق پستی ۴۷۴۱ ـ ۱۹۳۹۵

چکیده: شیوع کم‌خونی در گروه‌های سنی گوناگون در کشور، لزوم اجرای طرح غنی‌سازی مواد غذایی با آهن و فولیک اسید را نشان می‌دهد. نان، به عنوان اصلی‌ترین ماده غذایی ایرانی، ابزار مناسبی برای نیل به اهداف غنی‌سازی است. در این پژوهش اندازه گیری فولیک اسید نان غنی‌شده با سامانه کروماتوگرافی مایع مورد بررسی قرار گرفت. پیاده‌سازی روش تجزیه، آماده‌سازی نمونه و تعیین غلظت فولیک اسید نان در بازه غلظت mg/kg انجام شد. شرایط جداسازی در دستگاه HPLC برای شناسایی و اندازه گیری فولیک اسید با تغییر نسبت‌های حجمی حلال آلی و بافر (برای اصلاح سرعت عبور از ستون و تعیین زمان بازداری مناسب) بهینه‌سازی شد. پیش‌تغلیظ فولیک اسید با روش‌های استخراج فاز جامد، استخراج با نانوذره‌های مغناطیسی و میکرواستخراج با فیبرهای توخالی به صورت دو و سه فازی انجام شد و بر اساس نتیجه‌ها، روش فیبر توخالی دو فازی به عنوان بهترین روش انتخاب شد. در میان حلال‌های n-اکتانول، n- هگزانول، دودکان، ایزوبوتیل متیل کتون و بنزیل الکل در فیبرهای توخالی دو فازی دارای ۱۰٪ w/v Aliquat 336، اکتانول بیشترین بازده استخراج را داشت و در $pH = 8$ بیشترین بازده به دست آمد. بر اساس نسبت شیب منحنی کالیبراسیون با و بدون تغلیظ، ۶۹ درصد استخراج با عامل پیش‌تغلیظ ۳٫۵٪ حاصل شد. نمونه‌ها (پس از تجزیه بافت، استخراج، جداسازی و تغلیظ) برای تعیین میزان فولیک اسید به دستگاه HPLC تزریق شد. متوسط زمان لازم برای تزریق فاز تغلیظ شده و خروج از ستون یک ساعت بود. مقدار فولیک اسید موجود در نمونه‌های آرد غنی شده در بازه غلظت بین ۱mg/kg–۰٫۳ با میانگین ۵٫۹μg/kg نان به دست آمد. این مقدار کمتر از حد انتظار (غنی‌سازی اولیه آرد با غلظت ۱٫۵mg/kg فولیک اسید) بود که می‌تواند به علت دمای بالا در زمان پخت باشد. صحت داده‌ها با افزودن استاندارد داخلی بررسی شد و خطای کمتر از ۱۰٪ برای بازیابی نمونه به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: فولیک اسید، غنی‌سازی نان، کروماتوگرافی با کارایی بالا، میکرواستخراج دوفازی با فیبرهای تو خالی.

KEY WORDS: *Folic acid, Fortification of bread, HPLC, Two phase hollow fiber microextraction.*

*عهده دار مکاتبات

+E-mail: k.khosravi@sbmu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

فولیک اسید شکل سنتزی فولات (شکل‌های محلول در آب ویتامین B_9) است که به دلیل پایداری زیاد و رفع نیازمندی‌های تغذیه‌ای انسان در صنایع غذایی استفاده می‌شود. ویتامین B_9 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 حد ۱۴ µg/kg فراورده انجام می‌شود که این میزان چند برابر فولات‌های طبیعی موجود در نمونه‌های غذایی می‌باشد [۲]. به طور کلی سنجش میکروبیولوژیکی، تنها روش اندازه‌گیری فولات کل تأیید شده توسط AOAC است [۱]. محدودیت‌های این روش شامل نبود اطلاعات در مورد شکل‌های منفرد فولات مانند فولیک اسید ، تداخل به دست آمده از بافت نمونه و نیاز به صرف زمان معادل ۵ روز است [۳]. از این رو در سال‌های اخیر، پژوهش‌های گسترده‌ای برای اندازه‌گیری فولات با کروماتوگرافی مایع و الکتروفورز موئین انجام شده و روش‌های جدید آماده سازی صورت گرفته است [۱۱-۴]. در این روش‌ها فولات کل نمونه با سامانه چند آنزیمی قبل از تجزیه استخراج شده و در صورت نیاز تصفیه می‌شود [۱۷-۱۲].

قبل از جداسازی و اندازه گیری نمونه، به منظور استخراج و پیش‌تغلیظ مقدارهای کم و همچنین از بین بردن اثرهای بافت، روشهای آماده‌سازی مانند میکرواستخراج با فاز جامد[۱] (SPME) و حلال[۲] (SME یا LPME) صورت می‌گیرد. در این روش‌ها، حجم فاز استخراجی بسیار کمتر از حجم نمونه بوده و فقط کسر کوچکی از گونه به داخل فاز استخراج‌کننده منتقل می‌شود [۱۷-۵]. HF-LPME[۳] در واقع نوعی روش میکرواستخراج با غشای مایع نگهداری‌شده (SLM)[۴] می‌باشد که در آن حلال آلی توسط نیروهای مویینه، در منافذ فیبر قرار می‌گیرد و لایه‌ی نازکی را روی دیواره‌ی فیبر تشکیل می‌دهد. چند میکرولیتر فاز استخراجی به درون مجرای فیبر وارد می‌شود. وجود غشای آلی بین فازهای دهنده و گیرنده از اختلاط فازها جلوگیری می‌نماید. استخراج می‌تواند به مدت طولانی (بدون اتلاف فاز استخراجی) تا دستیابی به تعادل ادامه یابد. حجم فاز آلی مورد استفاده در این روش در قیاس با روش سه فازی LPME با تک‌قطره کمتر بوده و امکان تشکیل تعلیق (مشکل متداول روش LLE[۵]) حذف می‌شود [۷].

در این روش به طور معمول حجم نمونه بین ۵۰µL تا ۱L و حجم محلول گیرنده حدود ۲ تا ۳۰ µL می‌باشد.

Osseyi و *همکاران* برای اندازه‌گیری فولیک اسید در غلات غنی‌شده روشی شامل سه مرحله استخراج، پاکسازی و تجزیه کروماتوگرافی ارایه کردند [۳]. در روش آنها ۲ g نمونه در ۵۰ mL بافر فسفات ۰/۱ M دارای ۰/۰۵٪ آسکوربات (pH=۸-۹) به مدت ۱ ساعت همگن شده و تیمار آنزیمی با ۲mL محلول آبی ۲۵ mg/mL آلفا-آمیلاز مقاوم به گرما در pH=۶/۹ (۱ ساعت در ۶۵ درجه سلسیوس) صورت گرفت. پس از سانتریفوژ، رساندن حجم به ۵۰ mL ، عبور از صافی سر سرنگی ۰/۴۵ µm و تمیز سازی نهایی آن با روش SPE با کارتریج SAX، با روش RP-HPLC-UV با ستون ODS (فاز ساکن) و بافر فسفات ۰/۰۰۷ M دارای ۰/۰۰۵ M عامل زوج یون با pH=۶/۸ (فاز متحرک) در دمای محیط و طول موج ۲۸۰nm، مقدار فولیک اسید در نمونه اندازه‌گیری شد. نقطه ضعف این روش حد تشخیص کم آن در حدود ۲ ng/µL (یا ۲ mg/L) است و همچنین مراحل آزمایش زیاد آن می‌باشد.

روش EPBA برای تعیین فولیک اسید در غلات غنی‌شده توسط *Acort* معرفی و کیت‌های EPBA برای تخمین کمی میزان اسید فولیک استفاده شد [۲]. در این روش فولیک اسید استخراج شده توسط محلول بافر رقیق شده و به بازه غلظت ۰/۱-۲/۷ ng/mL می‌رسد. نمونه‌ها با استانداردهای فولیک اسید با استفاده از دستورالعمل کارخانه مورد سنجش قرار می‌گیرند. آنزیم کانجوگاز ۵۰ µL به میکروویال افزوده شده و ۱ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداشته می‌شود تا بین فولات‌های پیوندی با دیواره و فولات‌های آزاد در نمونه رقابت برای جذب به آنزیم صورت پذیرد. سپس محتویات حفره تخلیه و میکروحفره‌ها با محلول ویژه‌ای ۵ بار شسته و تخلیه می‌شود. محلول سوبسترا ۲۰۰ µL به هر میکروحفره اضافه شده و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می‌شود. در حضور آنزیم محلول بی‌رنگ سوبسترا به رنگ سبز تغییر می‌یابد که میزان رنگ به مقدار فولات موجود در نمونه مربوط می‌باشد. رنگ در ۴۱۴ nm توسط پلیت خوان اندازه‌گیری و نتیجه‌ها به صورت درصد اتصال بیان می‌شود. نقطه ضعف روش لزوم تهیه کیت‌های موردنظر و تحلیل نتیجه‌ها با استفاده از داده‌های درصد اتصال اشاره کرد.

(۱) Solid phase microextraction
(۲) Solvent microextraction or liquid phase microextraction
(۳) Hollow fiber liquid phase microextraction
(۴) Supported liquid mem
(۵) Liquid-liquid extraction

Archive of SID
www.SID.ir

Johansson و *همکاران* روشی را برای اندازه‌گیری میزان فولیک اسید و دیگر مشتق‌های آن در آرد نان صبحانه ارایه نمودند [۱۸]. پس از هضم سه آنزیمی نمونه‌ها، تجزیه نمونه‌ها با روش RP-HPLC-DAD[(۱)] با استفاده از ستون C8 (فاز ساکن) و مخلوط استیک اسید ۳۰ mM و استونیتریل (فاز متحرک)، انجام شده است. از نقاط ضعف این روش می‌توان به حد تشخیص پایین آن (۲ ng/μL یا ۲ mg/L) اشاره کرد چون غلظت فولیک اسید در نمونه‌های این پژوهش ۱٫۵ mg/L می‌باشد.

Pawlosky برای تعیین اسید فولیک در نان غنی شده [۱۹] روش زیر را به کار بردند. استخراج ۵ g نمونه با ۱۰۰ mL بافر فسفات ۰٫۰۳ mM دارای ۰٫۱٪ از ۲ ـ مرکاپتواتانول و ۱۲٫۸ μg $^{13}C_5$– فولیک اسید به عنوان استاندارد داخلی (۶۰ دقیقه) در حمام آب‌جوش انجام شد. ۲۴ ساعت پس از افزودن ۱٫۵ mL اتانول به ۱۰mL نمونه، سانتریفوژ شده و ۴ mL (برای پاکسازی با روش SPE و کارتریج LOAD (BOND-ELUT phenyl شده با ۱ mL بافر فسفات و ۱ mL فرمیک اسید ۰٫۱٪ شسته و ۰٫۵ mL محلول فاز متحرک در پایان جمع‌آوری می‌شود. تجزیه با روش LC/ESI-MS[(۲)] با استفاده از ستون ODS (فاز ساکن) و فاز متحرک ۴۰٪ آب و ۶۰٪ مخلوط ۲۶:۶۰:۱۴ از متانول، آب و استونیتریل انجام گرفت. نقطه ضعف این روش در دسترس نبودن فناوری گران قیمت آن است.

Gujska و *همکاران*، تأثیر مراحل پخت را بر پایداری فولیک اسید افزوده شده و فولات در نان‌های گندم و چاودار مورد بررسی قراردادند [۲۰]. آنها از روش ۳ آنزیمی برای هضم نمونه‌ها استفاده کردند.

Acort و *همکاران* روش خالص‌سازی همانند EPBA ارایه کردند [۲]. آنها تجزیه نمونه‌ها را با دستگاه کروماتوگرافی مایع مجهز به آشکارساز فلورسانس انجام دادند. از نقاط ضعف این روش می‌توان به مشکل تهیه کیت‌های EPBA اشاره کرد.

Poo-Prieto و *همکاران* با استفاده از روش Affinity/HPLC میزان فولیک اسید غلات غنی شده را تعیین کردند [۲۱]. آنها پس از هضم سه آنزیمی، جداسازی آنالیت ها را با روش افینیتی Folates Binding Protein (FBP) Affigel 10 انجام داده و محلول شفاف خروجی را به دستگاه HPLC تزریق کردند. ۲ ماده فولیک اسید و ۵ ـ متیل تتراهیدروفولات جداسازی شدند. فولیک اسید با آشکار ساز فرابنفش و ۵ ـ متیل تتراهیدروفولات با آشکارساز فلورسانس آشکارسازی شدند. از مشکل‌های این روش به در دسترس نبودن مواد و ستون افینیتی و زمان‌بر بودن تهیه آن می‌توان اشاره کرد.

در این پژوهش، تلاش برای توسعه و معتبرسازی فناوری HF-LPME دو فازی برای کمی‌سازی و تعیین مقدار فولیک اسید با سامانه کروماتوگرافی مایع در نمونه‌های نان غنی شده مورد بررسی قرارگرفت. دستاورد این پژوهش؛ پیاده سازی روش تجزیه‌ای دقیق و ساده برای تعیین غلظت فولیک اسید در نان در حد غلظت μg/L است که برای اولین بار در ایران انجام شد.

بخش تجربی

مواد و دستگاه‌ها

۵۵ نمونه نان غنی شده استان گلستان به صورت حضوری از محل‌های مشخص شده در برنامه غنی سازی آرد جمع آوری شدند. فولیک اسید، تولوئن، n–اکتانول، K_2HPO_4، از شرکت Merck آلمان؛ تری کاپریلیل متیل آمونیوم کلرید (Aliquat 336)، متانول، استونیتریل، اسید آسکوربیک از Acros آمریکا و آب یون‌زدایی شده از شرکت Millipore آمریکاخریداری شده و بدون خالص سازی استفاده شدند.

جداسازی و اندازه‌گیری گونه‌ها توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع ساخت شرکت Waters 510 انجام پذیرفت. این دستگاه مجهز به یک پمپ مدل 486 با دو ورودی حلال، دتکتور UV-Vis مدل 486 با گستره‌ی طول موج قابل تنظیم از ۱۹۰ تا ۷۰۰nm و محل تزریق دستی از نوع Rheodyne با حجم لوپ ۲۰ μl بود. برای ثبت کروماتوگرام و اندازه‌گیری سطح زیر پیک از نرم‌افزار Autochro-300 استفاده شد.

جداسازی‌ها در یک ستون تجزیه‌ای Capital C_{18} با طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر درونی ۴٫۶ mm که با ذراتی به اندازه‌ی ۵ μm پر شده بود، انجام شد. همچنین برای محافظت ستون به‌ویژه هنگام کار کردن با نمونه های کثیف، از ستون محافظ (با طول ۳ سانتی‌متر، قطر درونی ۴٫۶ mm پرشده با ذراتی به اندازه‌ی ۵ μm) استفاده شد. برای تهیه‌ی فاز متحرک از سامانه جداسازی شامل قیف فلزی، صافی‌های سلولز استات (۰٫۴۵μm) با نگه‌دارنده زیر قیف و یک پمپ خلاء غشائی استفاده شد. پس از بهینه نمودن شرایط جداسازی و اندازه‌گیری در دستگاه HPLC، شستشوی گونه‌ها

(۱) Reverse phase high-performance liquid chromatography-photodiode array detector

(۲) Investigated by electrospray ionisation-mass spectrometry

Archive of SID
www.SID.ir

به‌صورت شویش ایزوکراتیک با سرعت جریان ثابت ۱ mL/min انجام شد. برای این منظور مخلوطی از ۰/۰۰۵ مولار تترا بوتیل آمونیوم در بافر فسفات با pH = 8.0، متانول و استونیتریل استفاده شد. فاز متحرک طی مراحل جداسازی و اندازه‌گیری با ترکیب ۷۵٪ از این بافر شده دارای عامل زوج ـ یون کننده و ۲۵٪ از استونیتریل از درون ستون عبور داده شد. سپس برای خارج ساختن حلال استخراج کننده (اکتانول)، به مدت ۵ دقیقه ۱۰۰٪ متانول از ستون عبور داده شد و دوباره فاز متحرک با ترکیب درصد اولیه (۷۵٪ از بافر ذکر شده و ۲۵٪ از استونیتریل) عبور داده شد تا ستون به شرایط اولیه‌ی جداسازی برگردد و برای تزریق بعدی آماده شود. بعد از بهینه‌سازی شرایط جداسازی و اندازه‌گیری در دستگاه HPLC، اندازه‌گیری‌های کمی در طول موج ثابت ۲۸۰nm انجام پذیرفت.

تنظیم pH محلول‌ها با استفاده از دستگاه pH متر WTW ساخت کشور (آلمان) مجهز به الکترود مرکب شیشه انجام شد. برای هم‌زدن محلول‌ها از دستگاه هم‌زن مغناطیسی ساخت شرکت IKA (آلمان) و مگنتی به اندازه‌ی ۱۴ mm× ۴ استفاده شد. کلیه‌ی استخراج‌ها در ظروف ۶۰ mL صورت پذیرفت. فیبر توخالی (HF) از جنس پلی‌پروپیلن با قطر درونی ۶۰۰ µm و ضخامت دیواره‌ی ۲۰۰ µm و اندازه‌های منافذ ۰/۲ µm ساخت شرکت Membrana (آلمان) انتخاب شد.

جداسازی پیک

جداسازی مناسب با بهینه سازی نسبت فاز آلی (غیرقطبی) به آبی (قطبی) در فاز متحرک (برای شستشوی آنالیت از سطح فاز ساکن) صورت گرفت. زمان بازداری استاندارد فولیک اسید در دستگاه ۱۰ دقیقه بود. مخلوط بافر و حلال آلی (استونیتریل یا متانول) با ترکیب درصدهای گوناگون بررسی شد. مقایسه حلال‌های آلی متانول و استونیتریل برای اصلاح پیک نشان داد که استونیتریل به گرانروی کمتر آن نسبت به متانول منجر به تشکیل پیک‌های تیزتری شد. گرچه استفاده از حلال متانول صرفه اقتصادی داشت، اما به دلیل لزوم دقت و تکرارپذیری در داده‌های به دست آمده از این روش و اصلاح بیشتر پیک از حلال استونیتریل استفاده شد. برای بهینه سازی، این حلال با نسبت‌های ۶۵ به ۳۵ ؛ ۷۰ به ۳۰ ؛ ۷۵ به ۲۵ تهیه شده با بافر فسفات دارای عامل زوج یون کننده مورد بررسی قرار گرفت و نسبت ۷۵ به ۲۵ بافر به استونیتریل بهترین شرایط جداسازی را ارایه نمود.

استخراج فولیک اسید از آرد

۳g نمونه آرد داخل ارلن پوشیده شده از لایه آلومینیوم قرار گرفت و با ۶۰ mL بافر استخراجی مخلوط شد. بافر استخراجی شامل بافر فسفات با pH=۸ و دارای ۰/۲ درصد حجمی ۲-مرکاپتو اتانول (به عنوان آنتی‌اکسیدان) بود. علت استفاده از pH=۸ این بود که در شرایط قلیایی فولیک اسید یونیزه شده و حلالیت آن در فاز آبی افزایش می‌یابد. در این پژوهش از آنتی‌اکسیدان آسکوربیک اسید نیز برای جلوگیری از تجزیه فولیک اسید در زمان استخراج استفاده شد. اما به دلیل ایجاد رنگ زرد در ظرف دارای آسکوربیک اسید و تداخل با پیک فولیک اسید از ۲- مرکاپتواتانل به عنوان آنتی‌اکسیدان در ادامه پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور محلول پس از افزودن آنتی‌اکسیدان به بافر ۳۰ دقیقه برای اختلاط و استخراج نسبی در تکانه اربیتالی و ۳۰ دقیقه برای استخراج در حمام آب جوش قرار گرفت. پس از خنک شدن محلول و افزودن آنزیم *آلفا-آمیلاز* (برای تجزیه نشاسته و صاف شدن محلول) pH به ۶/۹ کاهش یافت. در این مرحله فولیک اسید پیوند شده با پلیمر نشاسته بافت آرد آزاد و به داخل بافر استخراج می‌شود. برای تکمیل واکنش مخلوط به مدت دو ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. در پایان، مخلوط به مدت پنج دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت تا *آلفا آمیلاز* موجود غیرفعال شود. پس از خنک شدن محلول از دستگاه سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۳۵ دقیقه برای ترسیب ذره‌های معلق و باقیمانده‌های فاز جامد آرد از محلول استفاده شد. سپس محلول با استفاده از صافی سر سرنگی سلولز استات با منافذ ۰/۴۵ میکرومتر صاف شد.

برای انجام مرحله پیش‌تغلیظ ابتدا از روش SPE[1] استفاده شد که ضریب تغلیظ مناسبی را برای اندازه‌گیری فولیک اسید با دستگاه HPLC نشان نداد. استفاده از نانو ذره‌های مغناطیسی [۲۲] نیز نتیجه‌های رضایت بخشی را نداشت. همچنین روش HF سه فازی برای تغلیظ فولیک اسید قابل استفاده نبود زیرا در این روش برای خنثی‌سازی بار مولکولی فولیک اسید در فاز گیرنده باید pH به کمتر از ۳ کاهش یابد که در این pH فولیک اسید ناپایدار می‌باشد. روش HF دو فازی نیز برای پیش‌تغلیظ استفاده شد. در این روش فاز دهنده (نمونه) و فاز گیرنده (محلول ۱۰ درصد Aliquat 336 در اکتانول) در تماس با یکدیگر قرار داده شدند. استفاده از حامل دارای بار مثبت برای تشکیل زوج یون

(۱) Solid phase extraction

Archive of SID
www.SID.ir

با فولیک اسید با بار منفی و افزایش خاصیت آب گریزی آن برای استخراج به درون فاز آلی می‌باشد. حلال آلی (دارای ۱۰٪ Aliquat 336) با سرنگ هامیلتون به درون یک فیبر توخالی تزریق شده و به صورت U شکل داخل محیط آبی قرار گرفت. در این حالت با قراردادن مگنت در محل ته ظرف و همزدن محلول به وسیله آن انتقال جرم از فاز دهنده به فاز گیرنده افزایش می‌یابد و میزان استخراج افزایش می‌یابد نتیجه‌ها نشان داد استفاده از این روش در عملیات پیش‌تغلیظ به طور کامل موفق است. به عبارت دیگر حامل کاتیونی با باندهای C8 بلند و غیرقطبی به خوبی در اکتانل حل شده و تمایل آنالیت را برای انتقال از فاز آبی به آلی تغییر داده و میزان استخراج را افزایش می‌دهد.

بهینه سازی pH فاز محلول دارای نمونه

استفاده از محلول‌های گوناگون با pH ۴،۵، ۷، ۸ و ۱۲ نشان داد که در pH ۸ به علت یونیزه شدن و ایجاد دو بار منفی بر روی آنالیت، شرایط برای نیل به هدف پیش‌تغلیظ با روش زوج ـ یون بیشتر مهیا می‌شود.

رسم منحنی کالیبراسیون اسید فولیک

از آنجا که فولیک اسید در گندم به شکل فولات وجود دارد، برای تهیه شاهد از محلول سنتزی فاقد فولیک اسید و با شرایط همانند سایر نمونه‌های نان استفاده شد. به این منظور در بافر استخراجی دارای ۲- مرکاپتواتانل مقدارهای مشخصی فولیک اسید افزوده شده و پس از استخراج به HPLC تزریق شد. منحنی کالیبراسیون با غلظت فولیک اسید ng/mL ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰، ۵، ۰ رسم شد و معادله $y= ۴/۳۱۲۹x + ۵/۰۶۹۴$ با ضریب برازش ۰/۹۹۴۵ به دست آمد.

تزریق نمونه‌ها و اندازه گیری اسید فولیک موجود

تجهیزات: جداسازی و اندازه‌گیری گونه‌ها توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع ساخت شرکت Waters 510 انجام شد. این دستگاه مجهز به یک پمپ مدل ۴۸۶ با دو ورودی حلال، آشکارساز UV-Vis مدل ۴۸۶ با گستره‌ی طول موج قابل تنظیم از ۱۹۰ تا ۷۰۰nm و محل تزریق دستی از نوع Rheodyne با حجم حلقه ۲۰ µm بود. برای ثبت کروماتوگرام و اندازه‌گیری سطح زیر پیک از نرم‌افزار Autochro-300 استفاده شد.

جداسازی‌ها در یک ستون تجزیه‌ای Capital C_{18} با طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر درونی ۴/۶ mm، پر شده با ذرات ۵ µm ، صورت گرفت. همچنین برای محافظت ستون به‌ویژه هنگام کار کردن با نمونه‌های کثیف، از ستون محافظ (با طول ۳ سانتی‌متر، قطر درونی ۴/۶ mm با ذراتی به اندازه‌ی ۵ µm) استفاده شد. برای تهیه‌ی فاز متحرک از سامانه جداسازی شامل قیف فلزی، صافی‌های استات سلولز (۰/۴۵ µm) با نگه‌دارنده زیر قیف و یک پمپ خلاء غشائی استفاده شد. پس از بهینه نمودن شرایط جداسازی و اندازه‌گیری در دستگاه، HPLC شستشوی گونه‌ها با شویش ایزوکراتیک با سرعت جریان ثابت ۱ mL/min انجام شد. برای این منظور مخلوطی از ۰/۰۰۵ مولار تترا بوتیل آمونیوم در بافر فسفات با pH = ۸، متانول و استونیتریل استفاده شد. فاز متحرک طی مرحله‌های جداسازی و اندازه‌گیری با ترکیب ۷۵٪ از بافر یاد شده دارای عامل زوج ـ یون کننده و ۲۵٪ از استونیتریل از درون ستون عبور داده شد. سپس برای خارج ساختن حلال استخراج کننده (اکتانول)، به مدت ۵ دقیقه ۱۰۰٪ متانول از ستون عبور داده شد و دوباره فاز متحرک با ترکیب درصد اولیه (۷۵٪ از بافر ذکر شده و ۲۵٪ از استونیتریل) عبور داده شد تا ستون به شرایط اولیه‌ی جداسازی برگردد و برای تزریق بعدی آماده شود. بعد از بهینه‌سازی شرایط جداسازی و اندازه‌گیری در دستگاه HPLC، اندازه‌گیری‌های کمی در طول موج ثابت ۲۸۰nm انجام شد.

تنظیم pH محلول‌ها با استفاده از دستگاه pH متر WTW ساخت کشور (آلمان) مجهز به الکترود مرکب شیشه انجام شد. برای همزدن محلول‌ها از دستگاه همزن مغناطیسی ساخت شرکت IKA (آلمان) و مگنتی به اندازه‌های ۱۴ mm × ۴ mm استفاده شد. همه‌ی استخراج‌ها در ظرف‌های ۶۰ mL انجام شد. فیبر توخالی (HF) از جنس پلی‌پروپیلن با قطر درونی ۶۰۰ µm و ضخامت دیواره‌ی ۲۰۰ µm و اندازه‌ی منافذ ۰/۲ µm ساخت شرکت Membrana (آلمان) انتخاب شد.

مرحله‌های میکرواستخراج مایع دو فازی با استفاده از فیبر توخالی

برای انجام استخراج از ظروفی با حجم ۶۰mL استفاده شد و سرنگ سرتخت با حجم ۵۰ µL از شرکت هامیلتون برای نگهداری فیبر طی استخراج و تزریق فاز استخراجی به دستگاه HPLC،

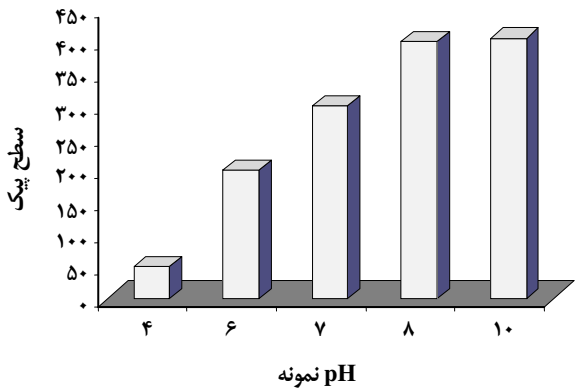
Archive of SID
www.SID.ir

به کار رفت. در کلیه‌ی مراحل، دو استخراج در شرایط همانندی انجام گرفت و از میانگین نتیجه‌ها استفاده شد. استخراج طی مرحله‌های زیرصورت پذیرفت.

فیبرهای پلی پروپیلن با طول ۹٫۰cm (حجم ۲۵ μm) تهیه و برای رفع آلودگی‌های احتمالی در استون و اولتراسونیک (به مدت ۵ دقیقه) قرار گرفته و در آون با دمای زیر ۸۰ °C خشک شدند. ظرف استخراج (۶۰mL) دارای مگنتی با اندازه‌ی ۴×۱۴ mm روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. محلولی از فولیک اسید با غلظت مشخص و دارای Na_2HPO_4 با غلظت ۰٫۰۱ مولار، ۰٫۱٪ مرکاپتو اتانول و pH حدود ۸٫۰ تهیه شد. ۶۰ mL از این محلول به ظرف استخراج انتقال داده شد (فاز دهنده) و روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. محلول ۱۰٪(w/v) از حامل Aliquat 336 در n– اکتانول تهیه شد (غشای آلی برای پر نمودن منفذهای فیبر و فاز گیرنده). حجم بیشتر از ۲۵ μL از فاز گیرنده درون سرنگ هامیلتون کشیده شد. فیبر به انتهای سوزن میکروسرنگ متصل شد و ۱۰ ثانیه در محلول اکتانول دارای ۱۰٪(w/v) از Aliquat 336 (برای پر شدن منفذها با حلال آلی) و سپس ۱۰ ثانیه در آب مقطر قرار داده شد. سپس فاز گیرنده به درون فیبر تزریق شد و انتهای فیبر توسط پنس فشرده و با ورقه‌ی آلومینیومی بسته شد. این مجموعه به صورت U شکل وارد محلول نمونه شده و میکروسرنگ به گیره بسته شد تا فیبر به طور کامل درون محلول قرار گیرد. پس از تکمیل استخراج (۴۰ دقیقه)، فیبر از محلول خارج شد و انتهای آن بریده شد. فاز گیرنده به میکروسرنگ کشیده شده و به طور مستقیم برای جداسازی و اندازه‌گیری فولیک اسید به دستگاه HPLC تزریق شد. برای جلوگیری از اثرهای حافظ بین استخراج‌های متوالی، پس از هر استخراج ظروف و مگنت توسط شوینده، آب مقطر و استون شسته شده و قبل از استفاده‌ی دوباره خشک شدند. همچنین سرنگ به دفعات توسط متانول و آب یون‌زدایی شده شسته شد و با توجه به قیمت پایین فیبرها، در هر استخراج از فیبر جدیدی استفاده شد.

نتیجه‌ها و بحث

روش میکرواستخراج مایع دوفازی با استفاده از فیبر توخالی بر مبنای تعادل بین دو فاز استوار است. با توجه به یونی بودن، فولیک اسید به شدت آب‌دوست بوده و از مقدار LogP خیلی کوچکی (در حد LogP<۰) برخوردار است که حکایت از تمایل نداشتن آن به خروج از محلول‌های آبی دارد و این مسئله استخراج آن را از آب بسیار دشوار می‌سازد. بنابراین به منظور استخراج، pH فاز آبی



شکل ۱ـ اثر pH محلول بر کارآیی استخراج فولیک اسید در نمونه نان غنی شده توسط HPLC .

به گونه‌ای تنظیم می‌شود که فولیک اسید به طور کامل به صورت یونی باشد. در این حالت هنگامی که فولات به جداره فیبر می‌رسد با Aliquot 336 (عامل زوج ـ یون دهنده) تشکیل زوج ـ یون داده با تبدیل به شکل آب‌گریز از نمونه به فاز آلی که درون منافذ فیبر و داخل فیبر قرار دارد، منتقل می‌شود.

بهینه‌سازی در محلول دارای ۱۰۰ μg/L از فولیک اسید انجام شد. بهینه‌سازی‌ها به صورت یک متغیر در زمان انجام پذیرفت و در هر مورد حداقل دو استخراج در شرایط همانند انجام شد. سرانجام سطح زیر پیک هر گونه به عنوان معیاری برای کارهای کمی استفاده شد و نتیجه‌ها به‌صورت میانگین ارایه شد. بررسی اثر pH فاز دهنده بر میزان استخراج، محلول‌هایی با غلظت ۰٫۰۱ مولار از Na_2HPO_4 تهیه شد و با افزودن سود و نیتریک اسید غلیظ، pH نمونه بین ۴ تا ۱۲ تغییر داده شد و استخراج از محلول‌ها صورت پذیرفت. نتیجه‌ها در شکل‌های ۴-۲ نشان داده شده است. بررسی pH فاز دهنده با توجه به اینکه فولیک اسید بسته به pH محلول به شکل‌های گوناگونی وجود دارد از اهمیت شایان توجهی برخوردار است.

مطابق شکل ۱ در pH حدود ۸ بهترین نتیجه‌ها به دست آمد. این موضوع به دلیل بالا بودن غلظت تعادلی گونه‌ی فولات در این بازه از pH می‌باشد. در این گستره از pH، قسمت بیشتر فولیک اسید به شکل آنیون دو بار منفی می‌باشد که می‌تواند در سطح مشترک نمونه ـ غشای آلی به ترکیب حامل کاتیونی متصل شده و به صورت زوج یون وارد غشای آلی شوند و از آنجا به درون فاز پذیرنده انتقال یابد. با افزایش pH بار منفی آنیون افزایش می‌یابد و در نتیجه با تعداد بیشتری حامل کاتیونی

Archive of SID
www.SID.ir

برهمکنش داده و زوج ـ یون حاصل هیدروفوب‌تر می‌شود و به دنبال آن استخراج به درون فاز گیرنده‌ی داخل فیبر افزایش می‌یابد.

گزینش غشای آلی مناسب و بررسی درصد ترکیب حامل در آن

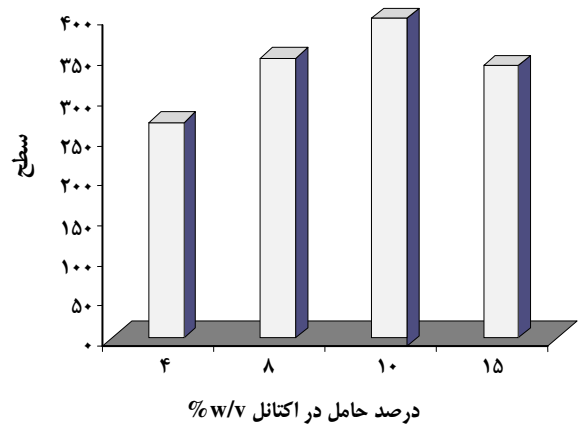
انتخاب حلال آلی مناسب در HF-LPME دارای اهمیت بسیار است. حلال انتخابی باید با آب غیرقابل امتزاج بوده و فراریت کمی داشته باشد، با فیبر پلی‌پروپیلن سازگار باشد و به خوبی در منافذ فیبر تثبیت شود تا طی هم‌زدن به محلول نشت نکند. لازم است تا ثابت توزیع گونه‌ها در حلال انتخابی خیلی پایین یا خیلی بالا نباشد تا ضمن انتقال گونه‌ها از نمونه به غشای آلی، همزمان استخراج برگشتی آن‌ها به فاز گیرنده با بازدهی بالا انجام پذیرد. به طور کلی ضریب‌های انتشار گونه‌ها در حلال‌های با گرانروی پایین بیشتر می‌باشد. به حلال‌های n- اکتانول، n- هگزانول، دودکان، ایزوبوتیل متیل کتون و بنزیل‌الکل ۱۰ درصد وزنی حجمی ترکیب حامل Aliquat 336 افزوده شد. اکتانول بهترین استخراج را نتیجه داد. درنتیجه در ادامه از اکتانول به عنوان حلال آلی برای پر نمودن منفذهای فیبر استفاده شد. در ادامه درصدهای گوناگون حامل در اکتانول بین ۴ تا (w/v)۱۵٪ تهیه شد و برای پر نمودن منافذ فیبر استفاده شد. مطابق شکل ۲ با افزایش درصد Aliquat در اکتانول تا ۱۰٪ کارآیی استخراج افزایش و سپس کاهش می‌یابد. این کاهش به دلیل افزایش گرانروی اکتانول در پی افزایش بیشتر ترکیب درصد Aliquat است که به نوبه خود باعث کاهش ضریب‌های نفوذ گونه‌ها در غشای آلی و در نتیجه کاهش کارآیی استخراج می‌شود.

اثر سرعت هم‌زدن

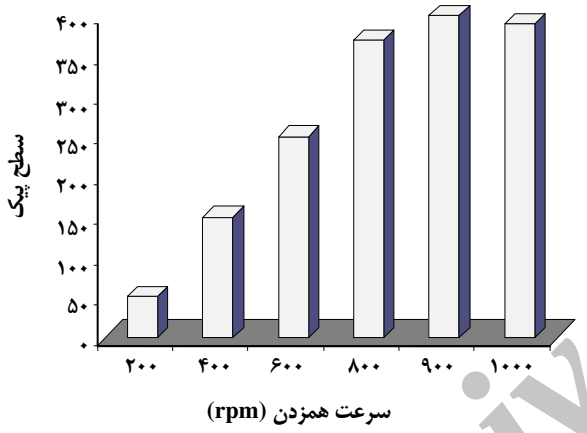
هم‌زدن نمونه باعث تسریع در انتقال جرم از فاز دهنده به فاز گیرنده می‌شود. اثر سرعت هم‌زدن بر کارآیی استخراج با استفاده از مگنتی با اندازه‌ی ۴×۱۴mm بررسی شد و نتیجه در شکل ۳ نشان داده شده است. سرعت‌های خیلی بالا به دلیل ایجاد حباب هوا در سطح فیبر توصیه نمی‌شود و با توجه به نتیجه‌ها، سرعت ۹۰۰ rpm برای ادامه‌ی کار انتخاب شد.

اثر زمان استخراج

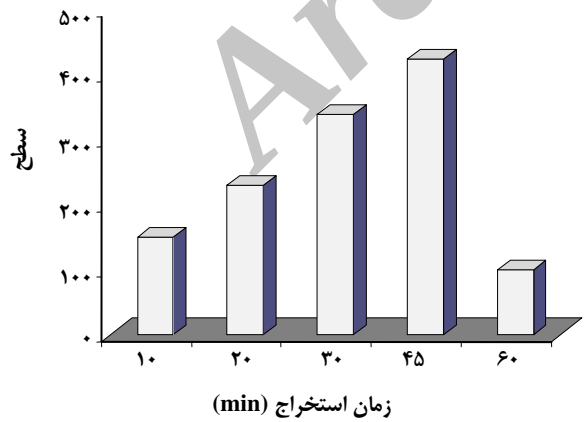
در این مطالعه اثر زمان بر کارآیی استخراج و تعیین زمان تعادل در شرایط بهینه، استخراج در زمانهای ۱۰ تا ۶۰ دقیقه بررسی شد. شکل ۴ نشان می‌دهد با افزایش زمان تا ۴۵ دقیقه،



شکل ۲ـ بررسی اثر غلظت ترکیب حامل بر کارآیی استخراج فولیک اسید در نمونه نان غنی شده توسط HPLC.



شکل ۳ـ بررسی اثر سرعت هم‌زدن بر کارآیی استخراج فولیک اسید در نمونه نان غنی شده توسط HPLC.



شکل ۴ـ بررسی زمان استخراج بر کارآیی استخراج فولیک اسید در نمونه نان غنی شده توسط HPLC.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱ـ ارقام شایستگی روش پیشنهادی برای فولیک اسید.

LOQ[a]	DLR[b]	R^2	RSD%[c]	EF[d]	E%[e]
۲/۰	۲/۰ ـ ۲۰۰	۰/۹۹۸۰	۷/۶	۶۹	۳/۵

a) LOQ: Limit of quantification (µg/L), b) DLR: Dynamic linear range (µg/L),
c)RSD%: relative standard deviation percent (n = 3, 50 µg/L), d) EF: Enrichment factor, e) E%: Exraction percent.

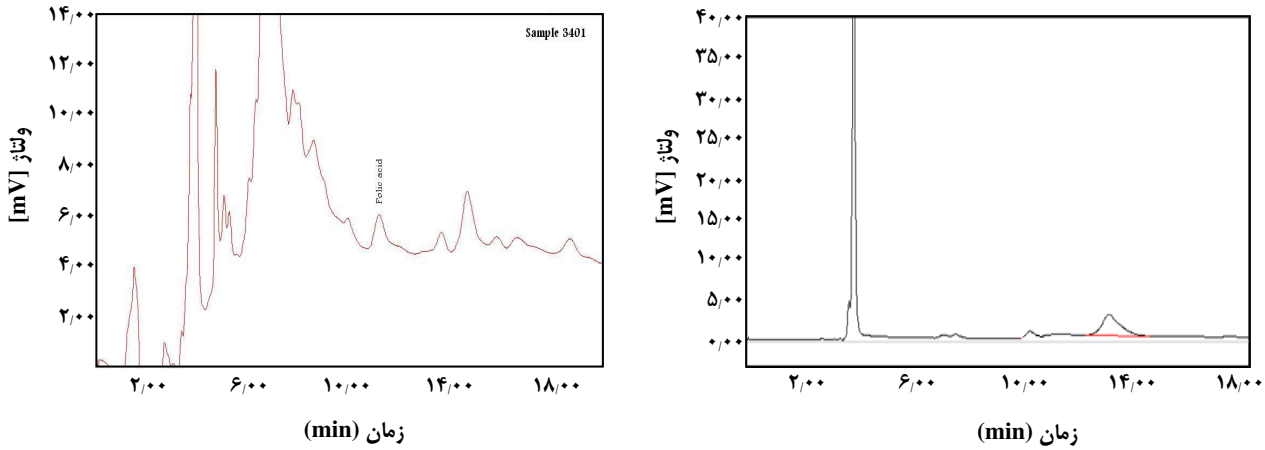
جدول ۲ـ مقدارهای فولیک اسید یافت شده در نمونه های آرد.

شماره ردیف	شماره نمونه	غلظت (mg/L)	غلظت (µg/۱۰۰g)	شماره ردیف	شماره نمونه	غلظت mg/L	غلظت (µg/۱۰۰g)
۱	SAM ۰۲۰۱	۰/۴۴	۴۴	۲۱	SAM ۳۹۰۲	۰/۳۶	۳۶
۲	SAM ۰۴۰۶	۰/۴۷	۴۷	۲۲	SAM ۴۰۰۴	۰/۲۵۷	۲۵/۷
۳	SAM ۰۵۰۱	۰/۳۶	۳۶	۲۳	SAM ۴۲۰۷	۰/۸۱	۸۱
۴	SAM ۰۸۱۰	۱/۶	۱۶۰	۲۴	SAM ۴۳۱۰	۰/۳۲۹	۳۲/۹
۵	SAM ۱۱۰۱	۰/۴۳	۴۳	۲۵	SAM ۴۵۰۱	۰/۶۸۴۴	۶/۴۴
۶	SAM ۱۲۰۱	۱/۰۵	۱۰۵	۲۶	SAM ۴۶۰۱	۰/۴۴۲	۴۴/۲
۷	SAM ۱۴۰۱	۰/۸۲	۸۲	۲۷	SAM ۵۰۰۱	۰/۱۸۴	۱۸/۴
۸	SAM ۱۶۰۱	۰/۵۶	۵۶	۲۸	SAM ۵۳۰۱	۰/۷۸۷	۷۸/۷
۹	SAM ۱۸۰۱	۰/۲	۲۰	۲۹	SAM ۵۴۰۱	۰/۲۸۱۷	۲۸/۱۷
۱۰	SAM ۱۹۰۱	۰/۴۲	۴۲	۳۰	SAM ۵۶۰۱	۰/۳۴۲	۳۴/۲
۱۱	SAM ۲۳۰۱	۰/۵۱۳	۵۱/۳	۳۱	SAM ۵۸۰۱	۱/۵۲۴	۱۵۲/۴
۱۲	SAM ۲۴۰۱	۰/۳۰۵	۳۰/۵	۳۲	SAM ۵۹۰۱	۰/۲۳۷۳	۲۳/۷۳
۱۳	SAM ۲۶۰۱	۰/۲۲۵۳	۲۲/۵۳	۳۳	SAM ۰۰۱	۰/۲۲۸۶۵	۲۲/۸۷
۱۴	SAM ۲۹۰۱	۱/۱۵	۱۱۵	۳۴	SAM ۳۴	۰/۶۳	۶۳
۱۵	SAM ۳۰۰۱	۱/۳۵۲	۱۳۵/۲	۳۵	SAM ۳۵	۰/۵۶	۵۶
۱۶	SAM ۳۱۰۱	۰/۱۷	۱۷	۳۶	SAM ۳۶	۰/۵۲	۵۲
۱۷	SAM ۳۳۰۱	۰/۲۲۵	۲۲/۵	۳۷	SAM ۳۷	۰/۶۱	۶۱
۱۸	SAM ۳۴۰۱	۰/۹۹۵	۹۹/۵	۳۸	میانی	۰/۵۹	۵۹/۰۶
۱۹	SAM ۳۷۰۱	۱/۵۹	۱۵۹	۳۹	انحراف معیار	۴۰/۰۰	
۲۱	SAM ۳۸۰۱	۰/۱۹	۱۹				

میزان استخراج افزایش می‌یابد. اما در زمان‌های بیشتر از ۴۵ دقیقه حجم فاز آلی کاهش می‌یابد که به علت از دست رفتن حلال می‌باشد که همین امر موجب کاهش بازده استخراج فولیک اسید می‌شد. .در نتیجه زمان ۴۵ دقیقه به عنوان زمان بهینه برای استخراج انتخاب شد. پس از تعیین شرایط بهینه‌ی استخراج، ویژگی‌های کمی و ارقام شایستگی روش مطالعه شد که در جدول ۱ خلاصه شده است.

غلظت فولیک اسید موجود در برخی نمونه‌های آردی نشان می‌دهد که بازه‌ی بین ۰/۳ تا ۱ mg/L می‌باشد. از آنجا که غنی‌سازی اولیه آرد با غلظت ۱/۵ mg/L از اسید فولیک انجام شده است این نتیجه‌ها می‌تواند به علت کاهش فولیک اسید در طی فرایند پخت نان و همچنین مدت زمان طولانی بین پخت و تجزیه نان‌ها باشد. صحت داده‌ها با اضافه کردن غلظت مشخصی از فولیک اسید (۲۵ ng/mL) به صورت دستی

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۵ـ کروماتوگرام به دست آمده از فولیک اسید (الف) و استخراج نمونه نان غنی شده با روش پیشنهادی در شرایط بهینه (ب).

و اندازه‌گیری میزان بازیابی آن مورد بررسی قرار گرفت که حد خطای به دست آمده کمتر از ۱۰ درصد و قابل قبول می‌باشد. در شرایط بهینه، به طور متوسط امکان تجزیه یک نمونه در هر یک ساعت وجود دارد.

مقدارهای اسید فولیک در نمونه

با تجزیه بیش ۴۰ نمونه نان گوناگون، متوسط مقدار فولیک اسید در حدود ۵/۹ µg/kg نان به دست آمد (جدول ۲) که این عدد نشان‌دهنده از دست رفتن میزان اولیه اسید فولیک در فرایند پخت و فاصله زمانی طولانی بین نمونه‌گیری و تجزیه می‌باشد. شکل ۵ کروماتوگرام به دست آمده از استخراج نمونه نان غنی نشده با روش پیشنهادی در شرایط بهینه را نشان می دهد.

نتیجه گیری

در این پژوهش روش جدیدی بر پایه میکرو استخراج با فیبرهای توخالی برای استخراج و پیش تغلیظ فولیک اسید از بافت نان ارایه شد. تیجه‌های به‌دست آمده نشان دهنده‌ی امکان استفاده از این روش برای اندازه‌گیری فولیک اسید در غلظت های پایین در حد ng/mL می‌باشد. در شرایط بهینه بیش از ۴۰ نمونه نان با روش پیشنهاد شده تجزیه شد و نتیجه‌های رضایت بخشی به دست آمد. بررسی غلظت فولیک اسید موجود در نمونه‌های نان نشان می‌دهد که مقدار آن در بازه‌ی بین ۰/۳ تا ۱ mg/L می‌باشد. از آنجا که غنی سازی اولیه آرد با ۱/۵ mg/L انجام شده است، کاهش فولیک اسید می تواند به علت گرمای زیاد فرایند پخت نان و همچنین مدت زمان طولانی بین زمان پخت و تجزیه نان‌ها باشد

قدردانی

این پژوهش با امکانات انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور و به درخواست و حمایت مالی دفتر بهبود تغذیه معاونت سلامت وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی انجام شده که از همکاری هر دو مرکز سپاسگزاری می شود.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۶/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۱۳

مراجع

[1] Lim H.S., Mackey A.D., Tamura T., Wong S.C., Picciano M.F., Measurable Human Milk Folate is Increased by Treatment with α-Amylase and Proteases in Addition to Folate Conjugase, *Food Chem.* **63**, p. 401 (1998).

[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.* **13**, p. 245 (2002).

Archive of SID
www.SID.ir

[3] Osseyi S.E., Wehling R.L., Albercht J.A., Liquid Chromatographic Method for Determining Added Folic Acid in Fortified Cereal Products, *J. Chromatogr. A.*, **826**, p. 235 (1998).

[4] Smith R.M., Before the Injection-Modern Methods of Sample Preparation for Separation Techniques, *J. Chromatogr. A.*, **1000**, p. 3 (2003).

[5] Lord H., Pawliszyn J., Microextraction of Drugs, *J. Chromatogr. A.*, **902**, p. 17 (2000).

[6] 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.*, **24**, p. 179 (1989).

[7] Arthur C.L., Pawliszyn J., Capillary Isoelectric Focusing with Whole Column Detection and a Membrane Sample Preparation System, *Anal. Chem.*, **62**, p. 2145 (1990).

[8] Pawliszyn J., "Solid Phase Microextraction: Theory and Practice", Wiley VCH, New York (1997).

[9] Ulrich S., Solid- Phase Microextraction in Biomedical Analysis*, J. Chromatogr. A.* **902**, p. 167 (2000).

[10] Mester Z., Sturgeon R., Pawliszyn J., Solid Phase Microextraction as a Tool for Trace Element Speciation, *Spectro. Chim. Acta B.*, **56**, p. 233 (2001).

[11] He Y., Lee H.K., Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe, *Anal. Chem.* **69**, p. 4634 (1997).

[12] Psillakis E., Kalogerakis N., Developments in Single-Drop Microextraction, *Trend. Anal. Chem.,* **21**, p. 54 (2002).

[13] Liu S., Dasgupta P.K., Liquid Droplet. a Renewable Gas Sampling Interface, *Anal. Chem.*, **67**, p. 2042 (1995).

[14] Liu H., Dasgupta P.K., Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop, *Anal. Chem.*, **68**, p. 1817 (1996).

[15] Jeannot M.A., Cantwell F.F., Solvent Microextraction into a Single Drop, *Anal. Chem.*, **68**, p. 2236 (1996).

[16] Xu L., Basheer C., Lee H.K., Developments in Single-Drop Microextraction, *J. Chromatogr. A.* **1152**, p. 184 (2007).

[17] Zhao E., Han L., Jiang S., Wang Q., Zhou Z., Application of a Single-Drop Microextraction for the Analysis of Organophosphorus Pesticides in Juice, *J. Chromatogr. A.*, **1114**, p. 269 (2006).

[18] Johansson M., Witthoft C.M., Bruce A., Jagerstad M., Study of Wheat Breakfast Rolls Fortified with Folic Acid, *Eur. J. Nut.*, **41**, p. 279 (2002).

[19] Pawlosky R.J., Hertrampt E., Flanagan V.P., Thomas P.M., Mass Spectral Determinations of the Folic Acid Content of Fortified Breads from Chile, *J. Food Compos. Anal.*, **16**, p. 281 (2003).

[20] 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.*, **60**, p. 37 (2005).

Archive of SID

www.SID.ir

[21] Poo-Prito R., Hytowitz D.B., Holden J.M., Rogers G., Choumenkovitch S.F., Jacques P.F., Selhub J., Use of the Affinity/HPLC Method for Quantitative Estimation of Folic Acid in Enriched Cereal-Grain Products, *J. Nutr.* **136**, p. 3079 (2006).

[22] Faraji M., Yamini Y., Rezaee M., Extraction of Trace Amounts of Mercury with Sodium Dodecyle Sulphate-Coated Magnetite Nanoparticles and Its Determination by Flow Injection Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry, *Talanta*, **81**, p. 831 (2010).

Archive of SID

www.SID.ir