

# سنتز پلیمر قالب مولکولی گزینش پذیر و کاربرد آن در استخراج فولیک اسید

سید محمد رضا میلانی حسینی\*، بیتا یاراحمدی، نصیبه سعیدزاده امیری

دانشکده شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران

**چکیده:** هدف از این پژوهش سنتز پلیمر قالب مولکولی فولیک اسید برای شناسایی و اندازه گیری سریع و آسان فولیک اسید با استفاده از دستگاه فلورسانس می باشد. در سنتز پلیمر قالب مولکولی برای افزایش استحکام و پایداری پلیمر، مقدارهای نسبت های مولی مونومر عاملی، اتصال دهنده عرضی و حلال مورد استفاده باید بهینه شوند. برای سنتز پلیمر از مونومر عاملی آکریل آمید، اتصال دهنده عرضی اتیلن گلیکول دی متا آکریلات و مولکول الگوی فولیک اسید استفاده شد و نسبت های مولی بهینه مونومر عاملی، اتصال دهنده عرضی و حلال با استفاده از دستگاه فلورسانس به دست آمدند. این مواد با محلول سل-ژل به دست آمده از افزودن تتراتیل ارتوسیلیکات، اتانول، اسید کلریدریک و آب مخلوط شد. پلیمریزاسیون به روش سل-ژل سبب تشکیل شبکه سه بعدی پلیمری در کمترین زمان و بدون نیاز به اعمال دما و فشار بالا شد. از جمله برتری های این پلیمر، توانایی در اندازه گیری دقیق فولیک اسید که یک ترکیب زیستی مهم برای سلامت انسان می باشد، تکرار پذیری زیاد، قابلیت استفاده مجدد، سهولت سنتز، مقرون به صرفه بودن و عدم ایجاد آلودگی برای محیط زیست می باشد. پلیمر قالب گیری شده برای استخراج فولیک اسید از درون نمونه حقیقی محلول قرص فولیک اسید در حلال دی متیل فرم آمید مورد استفاده قرار گرفت. تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی پلیمر پیش و پس از شست و شو توسط حلال بهینه، منحنی استاندارد و ظرفیت جذب پلیمر نیز بررسی شدند. مطابق نتیجه ها در سنتز پلیمر فولیک اسید، نسبت های مولی بهینه مولکول الگو، مونومر عاملی و اتصال دهنده عرضی ۱:۶:۲۰ به دست آمد. با استفاده از تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی پس از شست و شو پلیمر، به دلیل خروج مولکول های فولیک اسید از درون شبکه آن، حفره ها با اندازه های ۱۴۰-۲۸۵ nm در پلیمر ایجاد شد.

**واژگان کلیدی:** پلیمر قالب مولکولی، فولیک اسید، نانو متخلخل، سل-ژل.

**KEYWORDS:** Molecular Imprinted Polymer, Folic Acid, Nano porous, Sol-Gel.

## مقدمه

اسید و فولات به بدن کمک می کنند تا گلبول های قرمز جدید بسازد. سلول های قرمز خون اکسیژن را به تمام قسمت های بدن حمل می کنند. اگر بدن مقدار کافی گلبول قرمز تولید نکند، طبیعتاً

فولیک اسید<sup>۱</sup> نوعی از فولات یا همان ویتامین ب است. فولات در میوه ها، سبزی ها و آجیل ها به طور طبیعی یافت می شود. اما فولیک اسید در مکمل ها و غذاهای غنی شده یافت می شود. فولیک

\*Email: drmilani@iust.ac.ir

\*عهده دار مکاتبات

(۱) Folic acid

موجود در نان غنی شده در بازه غلظت‌های  $1 \text{ mg/Kg} - 3/0$  شدند [۱۰]. یکی دیگر از روش‌های پرکاربرد برای اندازه‌گیری و شناسایی فولیک‌اسید، روش فلورسانس می‌باشد. روش فلورسانس به این علت کاربرد فراوانی در اندازه‌گیری فولیک‌اسید دارد که با استفاده از این دستگاه، فولیک‌اسید در طول موج  $448 \text{ nm}$  نانومتر یک جذب قوی از خود نشان می‌دهد که برای اندازه‌گیری و شناسایی فولیک‌اسید به کار می‌رود. به عنوان مثال در سال  $2020$  میلادی چیاغولی<sup>۹</sup> و همکارانش نانوحسگری برای اندازه‌گیری فولیک‌اسید با استفاده از دستگاه فلورسانس طراحی کردند و موفق شدند فولیک‌اسید را در بازه غلظتی  $4 \text{ ng} - 37/4 \text{ ng} - 265/8 \text{ ng}$  با حد تشخیص  $48 \text{ nM}$  اندازه‌گیری کنند [۱۱]. پلیمرهای قالب مولکولی<sup>۱۰</sup> مواد قابل اطمینانی هستند که اخیراً به طور گسترده به عنوان عنصر تشخیص مورد استفاده قرار گرفته‌اند. پلیمرهای قالب مولکولی یک پلیمر سه بعدی و حاصل پلیمریزاسیون مونومرهای عاملی در حضور مولکول‌های نمونه می‌باشد که به دلیل وجود مکان‌های شناسایی درون شبکه پلیمری، دارای ویژگی‌های تشخیص مولکولی گزینشی می‌باشد. مونومر عاملی<sup>۱۱</sup> از لحاظ اندازه، شکل و جهت‌گیری گروه‌های عاملی مکمل مولکول نمونه هستند [۱۲]. در مقایسه با سایر سامانه‌های تشخیص، پلیمرهای قالب مولکولی دارای ویژگی‌های امیدوارکننده از قبیل هزینه کم، سنتز آسان، پایداری در محیط‌های اسیدی و بازی، تحمل دماهای بالا و پایین و قابلیت استفاده مجدد می‌باشند [۱۳]. با توجه به اهمیت زیستی ترکیب فولیک‌اسید در مطالعه‌های پزشکی و دارویی و نقش آن در سلامت انسان، در این پژوهش روشی سریع و دقیق برای رفع مشکل اندازه‌گیری فولیک‌اسید ارایه شده است. در این پژوهش قالب‌گیری مولکولی فولیک‌اسید به روش سل-ژل و بهینه‌سازی نسبت‌های مولی مونومر عاملی و اتصال‌دهنده عرضی<sup>۱۲</sup> انجام شد و پلیمر سنتز شده برای اندازه‌گیری فولیک‌اسید موجود در نمونه قرص مورد استفاده گرفت. یکی از برتری‌های پلیمر تهیه شده، قابلیت استفاده مجدد آن است و پلیمر سنتز شده مقرون به صرفه است. مطابق نتیجه‌ها پلیمر سنتز شده توانایی بالایی در اندازه‌گیری فولیک‌اسید از خود نشان داد و به این ترتیب با استفاده از روش قالب‌گیری

کم خونی ایجاد می‌شود. کم خونی زمانی اتفاق می‌افتد که خون نمی‌تواند به اندازه کافی اکسیژن را در بدن حمل کند [۱]. این بیماری باعث خستگی یا ضعف می‌شود. فولیک‌اسید از بدن جنین در برابر نقایص جدی مادرزادی محافظت می‌کند. همه زنان هر روز باید  $400$  میکروگرم فولیک‌اسید مصرف کنند. زنان باردار باید  $400$  تا  $800$  میکروگرم از این ماده را از روش مولتی ویتامین‌ها یا مواد غذایی دریافت کنند. این میزان علاوه بر فولاتی است که به طور طبیعی از غذا دریافت می‌کنند [۲]. با توجه به اهمیت فراوان فولیک‌اسید در سلامت بدن پژوهشگران در پی یافتن روشی برای اندازه‌گیری سریع و آسان مقدار فولیک‌اسید هستند و تعیین فولیک‌اسید به علت نیاز به شناسایی و اندازه‌گیری کمی آن در مطالعه‌های بالینی به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. روش‌های تجزیه‌ای متفاوتی از قبیل فلورسانس<sup>۱</sup> [۳]، اسپکتروفتومتری<sup>۲</sup> [۴]، میکرواستخراج<sup>۳</sup> [۵]، الکتروشیمیایی<sup>۴</sup> [۶] و کروماتوگرافی<sup>۵</sup> [۷] برای اندازه‌گیری فولیک‌اسید گزارش شده است. روش اسپکتروسکوپی یکی از روش‌های مورد استفاده برای اندازه‌گیری کمی داروها و مواد زیستی می‌باشد. برای مثال در سال  $2014$  میلادی ماتیا<sup>۶</sup> و همکارانش فولیک‌اسید موجود در نمونه دارو را با استفاده از روش اسپکتروسکوپی<sup>۷</sup> مرئی - فرابنفش در بازه غلظتی  $0/5 - 1/17 \text{ ng/ml}$  اندازه‌گیری کردند [۸]. روش‌های الکتروشیمیایی نیز در اندازه‌گیری داروها به دلیل حد تشخیص پایین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند. برای مثال در سال  $2017$  میلادی دارمندرا<sup>۸</sup> و همکارانش با استفاده از الکتروکربن اصلاح شده با نانوذره‌های طلا و با استفاده از روش ولتامتری موفق به اندازه‌گیری همزمان آسکوربیک‌اسید، اوره و فولیک‌اسید شدند [۹]. در صنعت دارویی یکی از روش‌های پرکاربرد در اندازه‌گیری داروها، روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا می‌باشد و پژوهش‌های زیادی در این زمینه انجام شده مثلاً در سال  $1392$  محمد فرجی و همکارانش پس از پیش تغلیظ فولیک‌اسید با استفاده از روش‌های استخراج فاز جامد، استخراج با نانوذره‌های مغناطیسی و میکرواستخراج با فیبرهای توخالی و با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا موفق به اندازه‌گیری فولیک‌اسید

(۱) Fluorescence Method

(۳) Solid Phase Micro Extraction

(۵) Chromatography

(۷) UV-Visible

(۹) ChuyaoLi

(۱۱) Functional Monomer

(۲) Spectrophotometry

(۴) Electrochemical Methods

(۶) Matias

(۸) Dharmendra

(۱۰) Molecularly Imprinted Polymers

(۱۲) Cross Linker

### سنتز پلیمر قالب مولکولی فولیک اسید

واکنش پلیمریزاسیون با مکانیزم سل-ژل<sup>۳</sup> صورت گرفت و برای آغاز واکنش‌ها در یک ظرف شیشه‌ای ۵۰ میلی‌لیتری درپوش دار، ۱ میلی‌لیتر تترااتیل ارتوسیلیکات، ۱ میلی‌لیتر اتانول، ۰/۴ میلی‌لیتر آب و ۰/۰۶ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ مولار را مخلوط کرد (pH محلول ۴/۰ تنظیم شد). سپس مقدار ۰/۱ میلی‌گرم آکریل‌آمید (مونومر عاملی)، ۱۰۰ میلی‌گرم اتیلن‌گلیکول دی‌متا‌آکریلات (اتصال‌دهنده عرضی) و ۱/۸ میلی‌گرم ۲و۲-آزوبیس-۲-ایزوبوتیرونیتریل به محلول اضافه شد تا واکنش پلیمریزاسیون آغاز شود. پس از آن محلول به مدت ۱ ساعت توسط همزن مغناطیسی با دور همزن ۸۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس همگن شد. پس از اتمام ۱ ساعت، ۰/۲ میلی‌گرم فولیک اسید حل شده در ۴ میلی‌لیتر دی‌متیل‌فرم‌امید، ۰/۲ گرم ستیل‌تری‌متیل‌آمونیم بروماید و ۳ میلی‌لیتر اتانول به محلول افزوده و محلول به مدت ۳ ساعت توسط همزن مغناطیسی با دور همزن ۸۰۰ دور بر دقیقه در دمای اتاق همزده شد. سنتز پلیمر قالب دار نشده<sup>۴</sup> نیز دقیقاً به همین روش ولی بدون حضور مولکول هدف (فولیک اسید) انجام پذیرفت [۱۴].

### تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی پلیمر قالب مولکولی تهیه شده پیش و پس از شست‌وشو

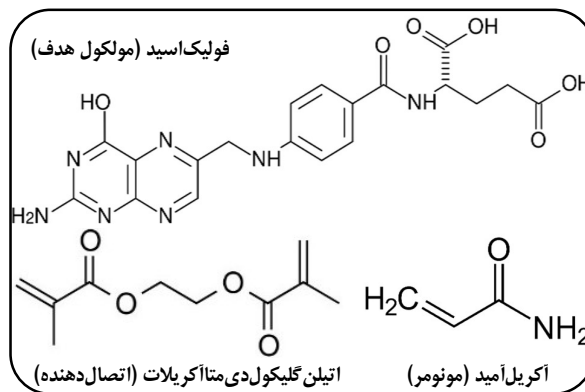
ریخت‌شناسی پلیمر قالب مولکولی تهیه شده پیش و پس از شست‌وشو توسط حلال مناسب با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت و تصویر پلیمر پیش و پس از شست‌وشو توسط حلال مناسب با یکدیگر مقایسه شدند.

### بهینه‌سازی نسبت مولی اتصال‌دهنده عرضی در سنتز پلیمر

به منظور بهینه‌سازی نسبت مولی اتصال‌دهنده عرضی در سنتز پلیمر، مطابق جدول ۱ مقادیرهای فولیک اسید و مونومر عاملی آکریل‌آمید با نسبت‌های مولی ۱:۶ ثابت نگه داشته شد و مقدار اتصال‌دهنده عرضی اتیلن‌گلیکول دی‌متا‌آکریلات تغییر داده شد.

### بهینه‌سازی نسبت مولی مونومر عاملی در سنتز پلیمر

به منظور بهینه‌سازی نسبت مولی مونومر عاملی در سنتز پلیمر، مطابق جدول ۲ مقادیرهای فولیک اسید و اتیلن‌گلیکول دی‌متا‌آکریلات



شکل ۱ - ساختار گسترده مواد اولیه واکنش

مولکولی فولیک اسید، می‌توان مقدار فولیک اسید را در نمونه‌های زیستی و داروها به سرعت، با دقت و با هزینه کم تعیین کرد.

### بخش تجربی

#### مواد

فولیک اسید با درصد خلوص ۹۹/۹۹٪ از شرکت داروسازی فارابی واقع در شهر تهران خریداری و استفاده شد. ترکیب ۲-۲-آزوبیس‌ایزوبوتیرونیتریل<sup>۱</sup> از شرکت سیگما-آلد ریچ خریداری شد. ترکیب‌های اتیلن‌گلیکول دی‌متا‌آکریلات، آکریل‌آمید، حلال دی‌متیل‌فرم‌امید، تترااتوکسی‌ارتوسیلیکات<sup>۲</sup> اسید کلریدریک، آمونیوم‌هیدروکسید، ستیل‌تری‌متیل‌آمونیم بروماید و هم چنین سایر معرف‌ها، حلال‌ها و ترکیب‌های مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک خریداری شدند. قرص فولیک اسید ۵ میلی‌گرمی از داروخانه فدک در منطقه شهریار استان تهران خریداری و به عنوان نمونه حقیقی استفاده شد. ساختار گسترده مواد اولیه اصلی واکنش در شکل ۱ آمده است.

#### دستگاه‌ها و روش‌ها

برای هم‌زدن محلول‌ها از هیتر-همزن مدل MR3003 control استفاده شد. برای تنظیم pH از دستگاه pH متر CORNING 140 استفاده شد. ریخت‌شناسی حسگر تهیه شده پیش و پس از شست‌وشو با حلال مناسب، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی Hitachi مدل S-4160 بررسی شد. اندازه‌گیری‌های فولیک اسید با استفاده از دستگاه فلورسانس مدل FL6500 Fluorescence انجام شد.

(۱) 2,2-Azobis isobutyronitrile

(۳) Sol-Gel

(۲) Tetraethoxysilane

(۴) Non-Imprinted Polymers

جدول ۱ - بهینه‌سازی نسبت مولی اتصال‌دهنده عرضی در سنتز پلیمر

| نسبت مولی کل | جذب    | نسبت مولی اتصال‌دهنده عرضی (mmol) | نسبت مولی مونومر عاملی (mmol) | نسبت مولی فولیک‌اسید (mmol) |
|--------------|--------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| ۱۶:۱۰        | ۰/۰۶۰۰ | ۰/۰۲۰۱                            | ۰/۰۱۲۰                        | ۰/۰۰۲۲                      |
| ۱۶:۱۲        | ۰/۰۵۰۰ | ۰/۰۲۴۱                            | ۰/۰۱۲۰                        | ۰/۰۰۲۲                      |
| ۱۶:۱۴        | ۰/۰۸۰۰ | ۰/۰۲۸۱                            | ۰/۰۱۲۰                        | ۰/۰۰۲۲                      |
| ۱۶:۱۶        | ۰/۰۷۰۰ | ۰/۰۳۲۲                            | ۰/۰۱۲۰                        | ۰/۰۰۲۲                      |
| ۱۶:۱۸        | ۰/۱۵۰۰ | ۰/۰۳۶۲                            | ۰/۰۱۲۰                        | ۰/۰۰۲۲                      |
| ۱۶:۲۰        | ۰/۱۸۰۰ | ۰/۰۴۰۲                            | ۰/۰۱۲۰                        | ۰/۰۰۲۲                      |

جدول ۲ - بهینه‌سازی نسبت مولی مونومر عاملی در سنتز پلیمر

| نسبت مولی کل | جذب    | نسبت مولی اتصال‌دهنده عرضی (mmol) | نسبت مولی مونومر عاملی (mmol) | نسبت مولی فولیک‌اسید (mmol) |
|--------------|--------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| ۱:۳:۲۰       | ۰/۰۷۰۰ | ۰/۰۳۶۱                            | ۰/۰۰۶۰                        | ۰/۰۰۲۲                      |
| ۱:۴:۲۰       | ۰/۰۵۰۰ | ۰/۰۳۶۱                            | ۰/۰۰۸۰                        | ۰/۰۰۲۲                      |
| ۱:۵:۲۰       | ۰/۰۸۰۰ | ۰/۰۳۶۱                            | ۰/۰۱۰۰                        | ۰/۰۰۲۲                      |
| ۱:۶:۲۰       | ۰/۱۲۰۰ | ۰/۰۳۶۱                            | ۰/۰۱۲۰                        | ۰/۰۰۲۲                      |
| ۱:۷:۲۰       | ۰/۱۰۰۰ | ۰/۰۳۶۱                            | ۰/۰۱۴۰                        | ۰/۰۰۲۲                      |
| ۱:۸:۲۰       | ۰/۷۰۰۰ | ۰/۰۳۶۱                            | ۰/۰۱۶۰                        | ۰/۰۰۲۲                      |

#### اندازه‌گیری فولیک‌اسید در نمونه حقیقی قرص

برای بررسی توانایی پلیمر تهیه شده در اندازه‌گیری فولیک‌اسید در ماتریس پیچیده، از آن برای تعیین فولیک‌اسید در نمونه حقیقی قرص، با استفاده از روش افزایش استاندارد استفاده شد. به این منظور ابتدا ۱۰ عدد قرص فولیک‌اسید ۵ میلی‌گرمی را به صورت پودر در آورده و با یکدیگر مخلوط نموده، تا نمونه یکنواختی به دست آید. سپس محلول ۲۰ μg/l فولیک‌اسید نمونه حقیقی دارو در ۴ بالون ۱۰ میلی‌لیتری به طور مجزا تهیه شد. پس از آن، سه محلول استاندارد فولیک‌اسید با غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ μg/l تهیه شده از فولیک‌اسید خالص، درون سه بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتر تهیه شدند. در انتها ۴ بالون حجمی ۲۵ میلی‌لیتری انتخاب شد و به بالون ۱ تنها محلول ۲۰ μg/l تهیه شده نمونه‌ی حقیقی در بالون ۱۰ میلی‌لیتر اضافه شد و با بافر مناسب به حجم رسانده شد. درون بالون ۲ محلول ۲۰ μg/l تهیه شده نمونه‌ی حقیقی به محلول استاندارد ۱۰ μg/l اضافه شد و با بافر به حجم رسانده شد. به بالون ۳ محلول ۲۰ μg/l نمونه حقیقی به محلول استاندارد ۱۵ μg/l اضافه شد و با بافر مناسب به حجم رسانده شد. سرانجام به بالون ۴ نیز محلول ۲۰ μg/l نمونه‌ی حقیقی به محلول استاندارد تهیه شده ۲۰ μg/l افزوده شد و با بافر به حجم رسانده شد. پس از اتمام این مرحله‌ها، استخراج و بررسی محلول‌های تهیه شده با استفاده از دستگاه فلورسانس به طور مجزا انجام شد.

با نسبت‌های مولی ۱:۲۰ ثابت نگه داشته شدند و مقدار مونومر عاملی یعنی آکریل‌آمید تغییر داده شد.

#### بهینه‌سازی حلال شست‌وشو فولیک‌اسید

برای شست‌وشو فولیک‌اسید از درون شبکه پلیمری پنج حلال متانول، دی‌متیل‌فرم‌آمید، استیک‌اسید، آب و سود مورد بررسی قرار گرفتند. حلالی که منجر به خروج بیشتر مولکول‌های فولیک‌اسید از درون شبکه پلیمری شد به عنوان حلال بهینه شست‌وشو انتخاب شد.

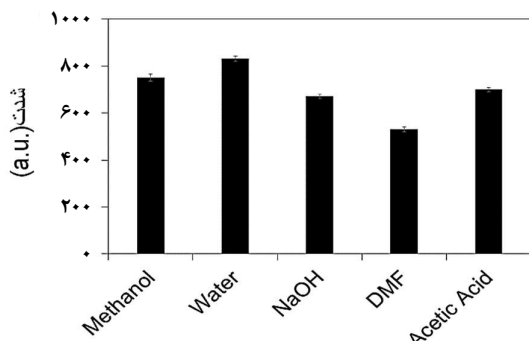
#### تهیه منحنی استاندارد جذب فولیک‌اسید

به منظور تهیه نمودار استاندارد، جذب محلول‌هایی با غلظت‌های گوناگون از فولیک‌اسید خالص در ۵۰ میلی‌لیتر حلال دی‌متیل‌فرم‌آمید در طول موج ۴۴۸ nm با دستگاه فلورسانس اندازه‌گیری شدند و نمودار استاندارد جذب و معادله مربوطه به دست آمد.

#### ارزیابی ظرفیت اتصال پلیمر

ظرفیت جذب پلیمر به صورت mg، μg یا میلی‌مول از مولکول هدف (فولیک‌اسید) جذب شده به ازای یک گرم از پلیمر گزارش می‌شود. در معادله ۱، C° غلظت اولیه، C غلظت نهایی، V حجم محلول و W وزن پلیمر می‌باشد.

$$Q = (C^{\circ} - C) \times V / W \quad (1)$$



شکل ۳ - بهینه‌سازی حلال شست‌وشو فولیک‌اسید

با نسبت‌های مولی ۱:۲۰ ثابت نگه داشته شدند و مقدار مونومر عاملی یعنی آکریل‌آمید تغییر داده شد. با توجه به نتیجه‌های به دست آمده مقدار جذب در نسبت مولی ۱:۶:۲۰ به عنوان مقدار بهینه انتخاب شد.

#### بهینه‌سازی حلال شست‌وشو فولیک‌اسید

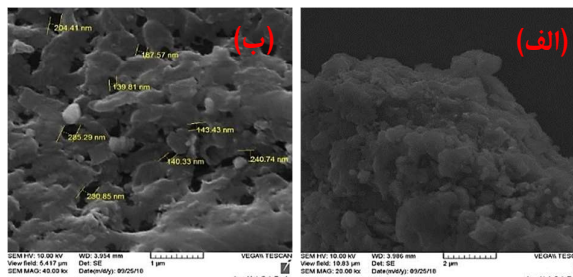
بیش‌ترین مقدار خروج مولکول‌های فولیک‌اسید از درون شبکه پلیمری توسط حلال دی‌متیل‌فرم/آمید صورت گرفت و هنگام استفاده از این حلال شدت پیک به حداقل مقدار خود رسید که این امر نشان‌دهنده شست‌وشوی بهتر مولکول‌های فولیک‌اسید از درون شبکه پلیمری می‌باشد. حلال‌های سود و استیک‌اسید توانایی کم‌تری نسبت به حلال دی‌متیل‌فرم/آمید برای شست‌وشوی مولکول‌های فولیک‌اسید از خود نشان دادند. حلال‌های متانول و آب توانایی خیلی کمی برای خروج مولکول‌های فولیک‌اسید داشتند و هنگام استفاده از آن‌ها شدت پیک به بیش‌ترین مقدار خود رسید که این امر نشان‌دهنده شست‌وشوی کم‌تر مولکول‌های فولیک‌اسید از درون شبکه پلیمری است. نمودار بهینه‌سازی حلال شست‌وشو فولیک‌اسید در شکل ۳ نمایش داده شده است.

#### تهیه منحنی استاندارد جذب فولیک‌اسید

برای بررسی و رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های گوناگون محلول فولیک‌اسید ۲۵۰-۲۰  $\mu\text{g/l}$  تهیه شدند و استخراج آن‌ها با استفاده از پلیمر قالب‌گیری شده انجام شد و سپس میزان شدت پیک‌های محلول‌ها بررسی شد. با توجه به نتیجه‌های به دست آمده، منحنی استاندارد رسم شد (شکل ۴ و ۵).

#### حد تشخیص

حد تشخیص (Limit of Detection) در واقع کم‌ترین میزانی از نمونه می‌باشد که با روش مورد نظر قابل شناسایی و اندازه‌گیری است.



شکل ۲ - تصویر پلیمر قالب مولکولی پیش (الف) و پس (ب) از شست‌وشو که توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گرفته شده است

## نتیجه‌ها و بحث

### تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی پلیمر قالب مولکولی تهیه شده پیش و پس از شست‌وشو

ریخت‌شناسی پلیمر قالب مولکولی تهیه شده پیش و پس از شست‌وشو توسط حلال مناسب با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. مطابق شکل ۲، پلیمر قالب مولکولی تهیه شده پس از شست‌وشو به علت خروج مولکول‌های فولیک‌اسید از درون شبکه پلیمری، دارای اندازه‌های ۲۸۵-۱۴۰ نانومتر می‌باشد. همان‌گونه که در تصویر الف مشخص است، پلیمر قالب‌گیری شده وقتی در محلول فولیک‌اسید قرار داده شود، مولکول‌های فولیک‌اسید، حفره‌های قالب‌گیری شده را اشغال کرده و در نتیجه در تصویر پلیمر حفره خالی مشاهده نمی‌شود، اما زمانی که پلیمر با حلال مناسب که توانایی حل کردن فولیک‌اسید را دارد شسته شود، مولکول‌های فولیک‌اسید از درون حفره‌ها خارج شده و حفره‌ها خالی می‌شوند (تصویر ب). قطر حفره‌ها برابر با قطر مولکول‌های قالب‌گیری شده (فولیک‌اسید) است.

### بهینه‌سازی عامل‌های مؤثر بر سنتز پلیمر

#### بهینه‌سازی نسبت مولی اتصال‌دهنده عرضی در سنتز پلیمر

به منظور بهینه‌سازی نسبت مولی اتصال‌دهنده عرضی در سنتز پلیمر، مطابق جدول ۱ مقادیرهای فولیک‌اسید و مونومر عاملی آکریل‌آمید با نسبت‌های مولی ۱:۶ ثابت نگه داشته شد و مقدار اتصال‌دهنده عرضی اتیلن‌گلیکول‌دی‌متا‌آکریلات تغییر داده شد. با توجه به نتیجه‌های به دست آمده مقدار جذب در نسبت مولی ۱:۶:۲۰ به عنوان مقدار بهینه انتخاب شد.

#### بهینه‌سازی نسبت مولی مونومر عاملی در سنتز پلیمر

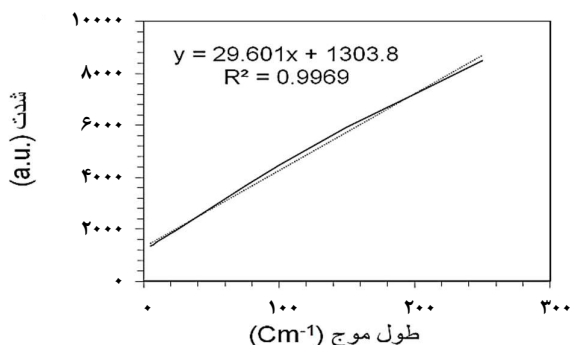
به منظور بهینه‌سازی نسبت مولی مونومر عاملی در سنتز پلیمر، مطابق جدول ۲ مقادیرهای فولیک‌اسید و اتیلن‌گلیکول‌دی‌متا‌آکریلات

جدول ۳ - ارزیابی ظرفیت اتصال پلیمر

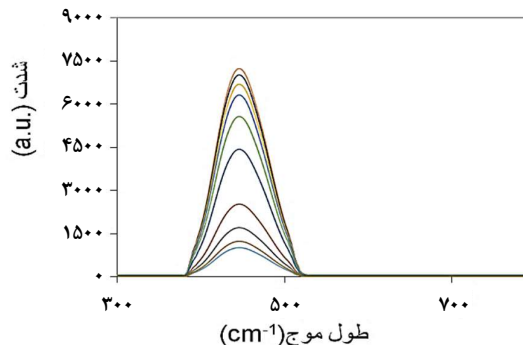
| نوع پلیمر | غلظت پیش از بارگذاری (μg/l) | شدت پیش از بارگذاری | غلظت پس از بارگذاری (μg/l) | شدت پس از بارگذاری | ظرفیت (mg/g) |
|-----------|-----------------------------|---------------------|----------------------------|--------------------|--------------|
| MIPs      | ۲۵                          | ۲۵۴۶                | ۲۰/۰۰۰۰                    | ۲۰۳۶/۸۰۰۰          | ۲۵۰          |
| MIPs      | ۵۰                          | ۳۳۳۴                | ۴۵/۳۲۰۰                    | ۳۰۱۲/۸۷۰۰          | ۲۳۴          |
| MIPs      | ۱۰۰                         | ۴۹۷۴                | ۹۵/۸۰۰۰                    | ۴۷۶۵/۰۹۰۰          | ۲۱۰          |
| MIPs      | ۱۵۰                         | ۶۹۵۸                | ۱۴۶/۳۲۰۰                   | ۶۷۸۶/۳۲۰۰          | ۱۷۵          |
| MIPs      | ۲۰۰                         | ۷۳۴۲                | ۱۹۶/۰۵۰۰                   | ۷۲۰۰/۹۱۰۰          | ۱۸۰          |
| MIPs      | ۲۵۰                         | ۷۸۷۶                | ۲۴۵/۹۶۰۰                   | ۷۷۴۷/۷۴۰۰          | ۲۰۲          |

جدول ۴ - تعیین فولیک اسید در نمونه حقیقی قرص (n=۳)

| ردیف | مقدار فولیک اسید (μg/l) | اضافه شده (μg/l) | بازیابی شده (μg/l) | درصد بازیابی (%) |
|------|-------------------------|------------------|--------------------|------------------|
| ۱    | ۲۰                      | ۰                | ۱۸/۰±۸۶/۹۱۰۰       | ۹۴/۰۲۰۰%         |
| ۲    | ۲۰                      | ۱۰               | ۲۸/۰±۰۲/۰۴۰۰       | ۹۴/۰۰۰۰%         |
| ۳    | ۲۰                      | ۱۵               | ۳۳/۰±۵۲/۷۳۰۰       | ۹۵/۰۸۰۰%         |
| ۴    | ۲۰                      | ۲۰               | ۳۶/۰±۰۲/۶۵۰۰       | ۹۰/۰۵۰۰%         |



شکل ۵ - تهیه منحنی استاندارد فولیک اسید



شکل ۴ - طیف فلورسانس غلظت‌های گوناگون فولیک اسید

پذیرفت. مقدار جذب محلول فیلتر شده پیش و پس از بارگذاری در طول موج ۴۴۸ nm اندازه‌گیری شد و نتیجه‌ها در جدول ۳ خلاصه شده است.

#### اندازه‌گیری فولیک اسید در نمونه حقیقی قرص

نتیجه هر آزمایش در اندازه‌گیری فولیک اسید در نمونه حقیقی قرص پس از سه مرتبه تکرار گزارش شده است (جدول ۴). نتیجه‌ها و داده‌های به‌دست آمده نشان می‌دهد که پلیمر تهیه شده کارایی بسیار خوبی برای تعیین فولیک اسید در نمونه‌هایی با ماتریس پیچیده (نمونه قرص) دارد.

#### قابلیت استفاده مجدد

یکی از برتری‌های پلیمر تهیه شده، قابلیت استفاده مجدد آن می‌باشد. به این ترتیب که پس از هر بار استفاده از آن و اندازه‌گیری

در این پژوهش برای به‌دست‌آوردن حد تشخیص باید کم‌ترین مقدار مولکول‌های فولیک اسید قابل اندازه‌گیری با استفاده از پلیمر قالب‌گیری شده، تعیین شوند. برای به‌دست آوردن حد تشخیص ۵ بار استخراج از محلول‌های مرجع (شاهد) که فاقد مولکول‌های فولیک اسید هستند، انجام شد و جذب شاهد در طول موج نمونه خوانده شد. مقدار حد تشخیص با استفاده از دستگاه فلورسانس ۰/۶۵ ppb به‌دست آمد. برای محاسبه مقدار حد تشخیص می‌توان از معادله ۲ استفاده کرد. (m حساسیت و  $S_b$  سیگنال مربوط به شاهد می‌باشد).

$$LOD = \frac{3S_b}{m} \quad (2)$$

#### ارزیابی ظرفیت اتصال پلیمر

مقدار پلیمر و حجم محلول در هر بارگذاری به ترتیب ۱۰ میلی‌گرم و ۵۰ میلی‌لیتر بوده و بارگذاری به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انجام

جدول ۵ - مقایسه‌ی روش مورد بررسی در این پژوهش و روش‌های دیگر برای اندازه‌گیری فولیک‌اسید

| روش مورد بررسی برای شناسایی      | سال پژوهش | نام روش                               | حد تشخیص (ppb)       | دامنه خطی (ppb)                           | مرجع     |
|----------------------------------|-----------|---------------------------------------|----------------------|---|----------|
| اسپکتروسکوپی                     | ۲۰۲۰      | استفاده از دستگاه UV-Visible          | ۰/۰۱۱                | ۱ - ۲۵                                    | ۴        |
| کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا | ۲۰۲۰      | میکرواستخراج مایع- مایع               | $۴/۸ \times ۱۰^{-۶}$ | $۱/۶ \times ۱۰^{-۴} - ۱/۶ \times ۱۰^{-۵}$ | ۱۵       |
| الکتروشیمی                       | ۲۰۲۰      | ولتامتری پالسی تفاضلی                 | ۰/۳۵۳                | ۱/۳۲۴ - ۱۱۰۳۵۰                            | ۱۶       |
| فلورسانس                         | ۲۰۲۰      | استفاده از طیف فلورسانس کوانتوم داتها | ۱۲۳/۵۹۲              | ۱۳۲/۴۲۰ - ۳۴۱/۴                           | ۱۷       |
| کار حاضر                         | ۲۰۲۱      | سل-ژل                                 | ٪ ۱/۳                | ۲۰ - ۲۵۰                                  | کار حاضر |

جداسازی، تصفیه آب، استخراج مواد شیمیایی و شیمی محیط زیست راه یافته است. با استفاده از روش قالب‌گیری مولکولی می‌توان داروها، ویتامین‌ها و مولکول‌های زیستی را قالب‌گیری کرد و به این ترتیب روشی آسان، سریع و دقیق برای اندازه‌گیری این ترکیب‌ها ارائه کرد. همچنین پلیمر تهیه شده با این روش مقرون به صرفه است و قابلیت استفاده مجدد را دارد. مطابق نتیجه‌های به‌دست آمده از این پژوهش با استفاده قالب‌گیری به روش سل-ژل فولیک‌اسید با دقت و به سرعت اندازه‌گیری شد. در دهه گذشته در کشور ما نیز این فناوری مورد توجه ویژه پژوهشگران قرار گرفته و امید است که شاهد پیشرفت‌های چشمگیری در این زمینه باشیم.

فولیک‌اسید، پلیمر را ابتدا با حلال دی‌متیل فرم‌آمید شست‌وشو داده تا مولکول‌های فولیک‌اسید از درون حفره‌ها قالب‌گیری شده خارج شوند. سپس پلیمر را به ترتیب با استون، اتانول و آب مقطر شست‌وشو داده و در دمای محیط خشک می‌شود تا آماده استفاده مجدد شود.

#### مقایسه با سایر روش‌ها

در این پژوهش، روشی نوین برای شناسایی و اندازه‌گیری فولیک‌اسید مورد بررسی قرار گرفت و با سایر روش‌هایی که برای شناسایی این ترکیب در سال‌های گذشته انجام شده است، مقایسه شد.

#### نتیجه‌گیری

امروزه رشد مقاله‌ها در زمینه پلیمرهای قالب‌گیری شده به سرعت در حال افزایش است و این فناوری در زمینه‌های گوناگونی مانند دارورسانی، داروسازی، ساخت حسگرهای شیمیایی و زیستی،

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۴

#### مراجع

- [1] Levine S.Z., et al., Association of Maternal use of Folic Acid and Multivitamin Supplements in the Periods Before and During Pregnancy with the Risk of Autism Spectrum Disorder in Offspring, *JAMA psychiatry*, **75(2)**: 176-184 (2018).
- [2] Beitollahi H., Ghofrani Ivani S., Torkzadeh-Mahani M., Voltammetric Determination of 6-Thioguanine and Folic Acid using a Carbon Paste Electrode Modified with ZnO-CuO Nanoplates and Modifier, *Materials Science and Engineering: C* **69**: 128-133 (2016).
- [3] Li H., et al., In Vivo Near Infrared Fluorescence Imaging and Dynamic Quantification of Pancreatic Metastatic Tumors using Folic Acid Conjugated Biodegradable Mesoporous Silica Nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **14(6)**: 1867-1877 (2018).
- [4] Modupe O., Maurras J.B., Diosady L.L., A Spectrophotometric Method for Determining the Amount of Folic Acid in Fortified Salt, *Journal of Agriculture and Food Research*, **2**: 100060 (2020).

- [5] Farajzadeh M.A., Niazi S., Sattari Dabbagh M., Development of Dispersive Solid Phase Extraction Utilizing Folic Acid as an Efficient and Green Sorbent Followed by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Extraction of Some Plasticizers from Aqueous Samples, *Journal of Separation Science*, **43(23)**: 4314-4321 (2020).
- [6] Cinková K., et al., Simple and Rapid Quantification of Folic Acid in Pharmaceutical Tablets using A Cathodically Pretreated Highly Boron-Doped Polycrystalline Diamond Electrode, *Analytical Letters*, **49(1)**: 107-121 (2016).
- [7] Wang F., et al., Simple Coupled Ultrahigh Performance Liquid Chromatography and ion Chromatography Technique for Simultaneous Determination of Folic Acid and Inorganic Anions in Folic Acid Tablets, *Food chemistry*, **239**: 62-67 (2018).
- [8] Matias R., et al., A UV Spectrophotometric Method for the Determination of Folic Acid in Pharmaceutical Tablets and Dissolution Tests, *Analytical Methods* **6(9)**: 3065-3071 (2014).
- [9] Shaikshavali P., et al., Fabrication, Characterization and Application of Poly (L-Cystine)/multi Walled Carbon Nanotubes Modified Glassy Carbon Electrode towards the Simultaneous Determination of Dopamine in presence of Uric Acid and Folic Acid, *ANALYTICAL & BIOANALYTICAL ELECTROCHEMISTRY*, **9(7)**: 940-955, (2017).

[۱۰] فرجی م.، آزادنیا ا.، خسروی دارانی ک.، استخراج و اندازه‌گیری فولیک‌اسید در نان غنی شده، نشریه شیمی و

مهندسی شیمی ایران، **۳۲(۳)**: ۱ تا ۱۱ (۱۳۹۲).

- [11] Li C., Yang Q., Wang X., Arabi M., Peng H., Li J., ... & Chen L., Facile Approach to the Synthesis of Molecularly Imprinted Ratiometric Fluorescence Nanosensor for the Visual Detection of Folic Acid, *Food chemistry*, **319**: 126575 (2020).
- [12] Mori K., Hirase M., Morishige T., Takano E., Sunayama H., Kitayama Y., ... & Takeuchi T., A Pretreatment-Free, Polymer-Based Platform Prepared by Molecular Imprinting and Post-Imprinting Modifications for Sensing Intact Exosomes, *Angewandte Chemie International Edition*, **58(6)**: 1612-1615 (2019).
- [13] Şensoy K.G., Muti M., Karagözler A.E., Highly Selective Molecularly Imprinting Polymer-based Sensor for the Electrochemical Determination of Metoxuron, *Microchemical Journal*, **158**: 105178 (2020).
- [14] Bakas I., et al. Electrochemical Impedimetric Sensor based on Molecularly Imprinted Polymers/Sol-Gel Chemistry for Methidathion Organophosphorous Insecticide Recognition, *Talanta*, **130**: 294-298130 (2014).
- [15] Faraji M., Mahmoodi-Maymand M., Dastmalchi F., Green, Fast and Simple Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method by using Hydrophobic Deep Eutectic Solvent for Analysis of Folic Acid in Fortified Flour Samples before Liquid Chromatography Determination, *Food chemistry*, **320**: 126486 (2020).



- [16] Sadeghi H., Shahidi S.A., Naghizadeh Raeisi S., Ghorbani-HasanSaraei A., Karimi F., Electrochemical Determination of Folic Acid in Fruit Juices Samples Using Electroanalytical Sensor Amplified with CuO/SWCNTs and 1-Butyl-2, 3-dimethylimidazolium Hexafluorophosphate, *Chemical Methodologies*, **4(6)**: 743-753 (2020).
- [17] Li W., Zhang X., Miao C., Li R., Ji Y., [Fluorescent Paper-based Sensor based on Carbon Dots for Detection of Folic Acid](#), *Analytical and bioanalytical chemistry*, **412**: 2805-2813 (2020).