

# اندازه‌گیری فولیک اسید توسط حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر نانو ذرات کربنی/نانو فیبر سلولز

معصومه قلخانی<sup>۱\*</sup>، سعید شاهرخیان<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>تهران- دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی- دانشکده علوم- گروه شیمی

<sup>۲</sup>تهران- دانشگاه صنعتی شریف- دانشکده شیمی

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۸/۲۳

تاریخ تصحیح: ۹۴/۰۸/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۷/۱۰

## چکیده

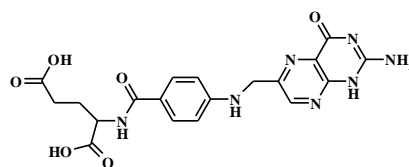
در کار حاضر، یک حسگر الکتروشیمیایی برای داروی فولیک اسید توسط نشانندن سوسپانسیون نانو رشته‌های سلولزی/نانو ذرات کربنی (CNFs/CNPs) بر روی الکتروود کربن شیشه‌ای ساخته شد. ترکیب نانو رشته‌های سلولزی با نانو ذرات کربنی منجر به تولید نوع جدیدی از نانو کامپوزیت‌های فعال الکتروشیمیایی شد. سطح لایه‌ی نانو رشته‌های سلولزی/نانو ذرات کربنی نشانده شده بر الکتروود کربن شیشه‌ای توسط تکنیک میکروسکوپی نیروی اتمی و میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج ولتامتری حاکی از افزایش چشمگیر جریان پیک آندی برای فولیک اسید (حدود ۲۷ برابر) بر روی سطح نانو رشته‌های سلولزی/نانو ذرات کربنی/الکتروود کربن شیشه‌ای نسبت به الکتروود عریان کربن شیشه‌ای بود. تحت شرایط بهینه، الکتروود اصلاح شده یک پاسخ خطی خوب نسبت به غلظت فولیک اسید در گستره‌ی ۰/۱ تا ۱۰ میکرومولار از خود نشان داد. حساسیت بالا، پایداری، تکرارپذیری و تکثیرپذیری خوب الکتروود همراه با حد تشخیص پایین را می‌توان به عنوان ویژگی‌های برجسته‌ی این الکتروود نام برد. این حسگر با موفقیت برای اندازه‌گیری دقیق مقدار فولیک اسید در نمونه‌های قرص به کار برده شد.

**واژگان کلیدی:** فولیک اسید، الکتروود اصلاح شده، نانو ذرات کربن، نانو فیبر سلولز، ولتامتری

## ۱-مقدمه

با توجه به اهمیت فولیک اسید (شمتایک ۱) در سیستم‌های زنده اندازه‌گیری دقیق و صحیح آن حائز اهمیت فراوان است [۱]. فولیک اسید ویتامینی محلول در آب است که توسط گیاهان، میکرو ارگانیسم‌ها (باکتری‌ها و مخمرها) تولید می‌شود. فولیک اسید جزو ویتامین های گروه B می‌باشد که در تولید پروتئین و ساخته شدن اسیدهای نوکلئیک در بدن نقش به سزایی ایفا می‌کند و یکی از موادی است که سبب پیشگیری از بروز اختلالات در تکامل لوله عصبی در جنین می‌گردد [۲]. چون این ویتامین در بدن تجمع نمی‌یابد و از طریق ادرار دفع می‌شود لازم است که روزانه در رژیم غذایی موجود باشد. کاهش آن در مایعات بدن منجر به عوارض مختلف از جمله کم خونی، روان پریشی و افزایش احتمال حمله قلبی و سکته مغزی می‌شود [۳ و ۴]. محققان اثبات کرده‌اند که کاهش غلظت فولات با افزایش سرطان همراه است که علت آن شرکت فولیک اسید همراه با ویتامین B12 در سنتز نوکلئوتید، تقسیم سلولی و بیان ژن می‌باشد [۳ و ۵].

عوارض کمبود طولانی مدت آن در یک فرد بالغ، کم خونی، متورم و قرمز شدن زبان، اختلالات گوارشی مانند اسهال و اختلالات روحی چون افسردگی است و تأثیر کمبود آن در کودکان نیز کاهش رشد در آنهاست [۶]. از طرفی مصرف بیش از حد آن عوارض جانبی دیگری را ایجاد می‌کند [۷]. برای مثال در افرادی که حامل تومورهای پیش سرطانی هستند افزایش مقدار فولیک اسید بیش از حد نیاز و طبیعی خطر بروز و رشد سرطان را تشدید می‌کند [۷]. بنابراین اندازه‌گیری فولیک اسید از جنبه بالینی از اهمیت بالایی برخوردار است. تکنیک‌های مختلفی برای اندازه‌گیری مقادیر فولیک اسید در نمونه‌های زیستی و ترکیبات دارویی نظیر لومینسانس شیمیایی تزریق در جریان [۸]، فلوریمتری فوتو شیمیایی [۹]، کروماتوگرافی زوج یون [۱۰]، الکتروفورز موئینه [۱۱]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا [۱۲]، کروماتوگرافی مایع- اسپکتروسکوپی جرمی [۱۳]، گزارش شده است. به هر حال این روش‌ها از معایبی نظیر، قیمت بالا، زمان تجزیه بالا و نیاز به پیش پرداخت نمونه سخت و پیچیده و در برخی موارد حساسیت و گزینش پذیری پائین رنج می‌برند که باعث نامناسب بودن آنها برای اندازه‌گیری روزانه شده است. یافتن روشی مناسب با حساسیت بالا، ساده و کارآمد برای اندازه‌گیری این دارو ضروری می‌باشد. تکنیک‌های الکتروشیمیایی با استفاده از الکترودهای اصلاح شده می‌توانند جایگزینی قوی برای روش‌های مذکور به حساب آیند [۱۴-۲۳]. اصلاح سطح الکترودها باعث تسهیل انتقال الکترون بین گونه آنالیت و الکتروده می‌گردد، بنابراین حساسیت و گزینش پذیری واکنش را افزایش می‌دهد [۲۴ و ۲۵]. اصلاح سطح الکترودهای کربنی آسان می‌باشد و می‌تواند از طریق اتصال فیزیکی یا توسط پیوند کولانسی اصلاحگر به سطح الکتروده انجام شود.



شما تیک ۱- ساختار شیمیایی فولیک اسید

روش‌های الکتروشیمیایی با توجه به کارایی خوبشان از نقطه نظر صحت و دقت بالا و ارزان قیمت بودن و سرعت مناسب جمع آوری داده‌ها، تکنیکی مناسب برای آنالیز سریع و صحیح نمونه‌های مورد نظر می‌باشند. تهیه الکترودهی اصلاح شده که دارای حد تشخیص و گستره خطی مناسب باشد و پاسخ‌های حاصله آن دقت و صحت خوب، تکرارپذیری و تجدید پذیری بالا داشته باشند و در عین حال تهیه آن ساده و ارزان قیمت باشد بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در این پژوهش، فعالیت کاتالیزوری برجسته نانو ذرات کربنی- نانو رشته‌های سلولز نسبت به اکسایش الکتروشیمیایی فولیک اسید بررسی شده است. نتایج نشان دادند که CNPs/CNFs/GCE اثر الکتروکاتالیتیکی برجسته‌ای نسبت به الکترو اکسایش فولیک اسید نشان می‌دهد که منجر به بهبود قابل توجه جریان پیک اکسایشی می‌شود. به‌علاوه پایداری، طول عمر و خواص شیمیایی الکتروده اصلاح شده جدید

بررسی شدند و بر اساس نتایج حاصله، روش الکتروشیمیایی جدیدی جهت اندازه‌گیری تکرارپذیر و حساس فولیک اسید در نمونه‌های دارویی و کلینیکی توسعه داده شد.

## ۲- بخش تجربی

### ۲-۱- مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده

فولیک اسید، آسکوربیک اسید و اوریک اسید با درجه خلوص کروماتوگرافی گازی از شرکت مرک، خریداری شدند. نانوذرات کربنی با قطر بین ۹ تا ۱۸ نانومتر از شرکت امپور 2000، شرکت کابوت انگلستان خریداری و بدون خالص سازی بیشتر استفاده شد. فسفریک اسید، استیک اسید، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات و پتاسیم هیدروکسید استفاده شده در تهیه بافرها، همگی از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. همه مواد شیمیایی دیگر با خلوص "معرف تجزیه‌ای" از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. محلول‌های بافر فسفات با افزودن محلول‌های رقیق  $H_3PO_4$  یا KOH به محلول ۰/۱ مولار نمک  $KH_2PO_4$  (بافر فسفاتی) و محلول‌های بافر استات با افزودن محلول رقیق KOH به محلول ۰/۱ مولار استیک اسید (بافر استاتی) و تنظیم pH محلول حاصل با استفاده از دستگاه pH متر تهیه شدند.

### ۲-۲- نمونه دارویی

قرص فولیک اسید (۱ میلی‌گرمی در ازای هر قرص) از شرکت ایران دارو (تهران، ایران) از داروخانه محلی خریداری شدند. پنج عدد از این قرص در ۱۰ mL محلول بافر فسفات با pH=۲ حل شد و در اندازه‌گیری‌های کمی با روش ولتامتری پالس تفاضلی به کار برده شد.

### ۲-۳- حلال‌ها و گازهای مورد استفاده

حلال دی متیل فرمامید (DMF)، متانول و اتانول بکار رفته، از شرکت مرک خریداری شدند. برای تهیه محلول‌های بافر و سایر محلول‌ها از آب دوبار تقطیر شده استفاده گردید. گاز نیتروژن با درجه خلوص ۹۹/۹۹۹ درصد جهت گاز زدائی محلول‌ها در مطالعات "ولتامتری چرخه‌ای" و "ولتامتری پالس تفاضلی" از شرکت رهام گاز ایران تهیه گردید.

### ۲-۴- دستگاه‌های مورد استفاده

کلیه مطالعات ولتامتری با استفاده از دستگاه پتانسیواستات / گالوانو استات (سما ۵۰۰، سیستم آنالیزور، ایران) انجام شد. اندازه‌گیری‌های ولتامتری در یک سل سه الکترودی متشکل از الکتروود مرجع Ag/AgCl حاوی محلول اشباع پتاسیم کلرید، الکتروود کمکی سیم پلاتین و الکتروود کار کربن شیشه‌ای (اصلاح شده و یا اصلاح نشده) صورت گرفتند. برای تهیه محلول‌های بافر به‌عنوان الکتروولیت حامل در آزمایش‌های ولتامتری، از دستگاه pH/mV/Ion متر مدل (MI 180) Milwaukee ساخت کشور رومانی استفاده شد. از دستگاه جک اولتراسونیک ساخت شرکت کدو (KODO) کره جنوبی مدل ۱۲۰۰ برای تمیز کردن

سطح الکترودها، پخش بهتر نانوذرات کربنی و تهیه محلول‌های همگنی از نمونه‌های مورد آزمایش استفاده شد. تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) توسط دستگاه SEM ساخت شرکت VEGA2 TESCAN از کشور جمهوری چک متعلق به مرکز متالوژی رازی تهیه گردیدند.

## ۲-۵- آماده سازی الکترودهای کربن شیشه‌ای قبل از فرآیند اصلاح سطح

قبل از تثبیت فیلم‌های اصلاح کننده روی سطح الکترودهای کربن شیشه‌ای، ابتدا باید سطح آن کاملاً صیقل مکانیکی داده شده و پرداخت گردد. به این منظور ابتدا الکترودهای کربن شیشه‌ای با پودر آلومینای ۰/۰۵ میکرومتری صیقل داده و سپس با آب مقطر دوبار تقطیر شستشو داده شد. در مراحل بعد، ابتدا الکترودها در محلول اتانول و سپس در محلول آب مقطر دوبار تقطیر غوطه‌ور گردید و در هر مرحله به مدت ۵ دقیقه در حمام فراصوت قرار داده شد. در آخرین مرحله، به منظور اطمینان از عاری شدن سطح الکترودها از هرگونه ناخالصی، سطح الکترودهای کربن شیشه‌ای به روش الکتروشیمیایی پرداخت شد. بدین صورت که الکترودها در سل الکتروشیمیایی حاوی محلول بافر فسفات با  $\text{pH}=2/5$  قرار داده شد و تحت اعمال پتانسیل روبشی در محدوده ۱- ولت تا ۱+ ولت طی اعمال ۵ سیکل پتانسیل پلاریزه گردید. پس از اتمام عملیات فوق، الکترودها مربوطه بوسیله آب مقطر دو بار تقطیر کاملاً شستشو داده شد و به عنوان الکترودهای اصلاح نشده در مطالعات ولتامتری بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

## ۲-۶- تهیه الکترودهای کربن شیشه‌ای اصلاح شده با لایه نازکی از کامپوزیت نانو ذرات کربنی-نانو رشته‌های سلولز

سوسپانسیون اصلاحگر با پراکندن ۲ میلی‌گرم نانو ذرات کربنی در ۲ میلی‌لیتر محلول ۰/۱٪ از نانورشته‌های سلولز در حلال دی متیل فرم آمید تحت امواج فراصوت به مدت نیم ساعت تهیه شد، که تولید سوسپانسیون سیاه رنگی نمود که با علامت اختصاری CNPs/CNFs نشان داده می‌شود. مقدار ۱ میکرولیتر (مقدار بهینه) از سوسپانسیون حاصله با کمک میکروسرنگ به طور مستقیم بر روی سطح الکترودهای کربن شیشه‌ای گذاشته شد و حلال در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  در آون خشک شد. الکترودهای تهیه شده با عبارت اختصاری CNPs/CNFs/GCE بیان می‌شود که در دمای محیط نگهداری شده و حتی بعد از استفاده در محیط‌های آبی پایدار بود. در این کار، هر زمان که لازم بود، تجدید سطح الکترودها به راحتی توسط قرار دادن الکترودهای اصلاح شده در محلول بافر فسفات و اعمال ولتامتری چرخه‌ای در گستره ۰/۰ الی ۱/۲ ولت، صورت گرفت.

## ۳- بحث و نتیجه‌گیری:

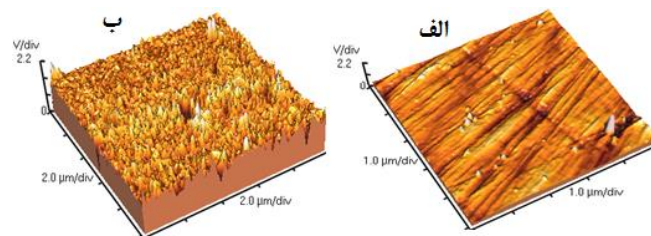
### ۳-۱- مطالعه الکتروشیمیایی فولیک اسید در سطح الکترودهای اصلاح شده با لایه نازک کامپوزیت نانوذرات کربنی

در این مطالعه، روش الکتروشیمیایی موثری با حد آشکارسازی کمتر از میکرومولار بر اساس استفاده از الکترودهای اصلاح شده با لایه نازکی از کامپوزیت نانو ذرات کربنی-نانورشته‌های سلولز جهت اندازه‌گیری فولیک اسید توصیف گردید. لایه اصلاح شده

با لایه نازک نانو ساختاری از نشانیدن CNP/CNFs بر روی سطح GCE حاصل شد. رفتار الکتروشیمیایی فولیک اسید در سطح الکتروود اصلاح شده به روش ولتامتری چرخه‌ای بررسی گردید.

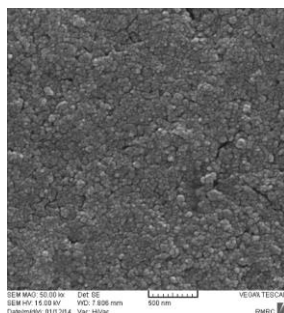
### ۳-۲- مطالعات مورفولوژی سطح الکتروود اصلاح شده

مورفولوژی لایه اصلاح کننده تشکیل شده در سطح الکتروود کربن شیشه‌ای بوسیله تکنیک میکروسکوپی نیروی اتمی (AFM) مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱ تصاویر AFM بدست آمده از سطوح GCE و CNPs/CNFs/GCE را نشان می‌دهد. با دقت در این تصاویر مشخص می‌شود که مورفولوژی سطح در اثر حضور CNPs/CNFs نشانده شده بر روی GCE کاملاً تغییر یافته است.



شکل ۱- تصاویر AFM مربوط به سطح الکتروود کربن شیشه‌ای (الف) اصلاح نشده و (ب) اصلاح شده با لایه نازک CNPs/CNFs

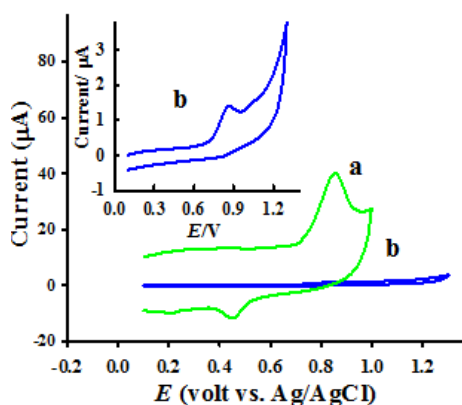
همانطور که در تصاویر مربوطه هم ملاحظه می‌شود، سطح الکتروود کاملاً بصورت همگن و یکنواخت توسط لایه اصلاحگر پوشش داده شده است. این ساختار بسیار یکنواخت با تخلخل بالا از لایه‌های CNPs/CNFs که از طریق فرآیند قطره نشانی از سوسپانسیون اصلاحگر شکل گرفته، مساحت سطح فعال بسیار وسیع را ایجاد می‌کند که یکی از دلایل اصلی در بهبود خواص سطح الکتروود در مقابل نفوذ گونه‌های الکترواکتیو است. از اندازه‌گیری‌های صورت گرفته بر مبنای تصاویر AFM، ضخامت لایه‌های CNPs/CNFs کمتر از ۱۰۰ nm تخمین زده شده است که در حوزه اندازه نانومتری می‌باشد. ساختار میکروسکوپی CNPs/CNFs با استفاده از تصاویر SEM بررسی شد. شکل ۲ مبین حضور نانو ذرات در سطح الکتروود کربن شیشه‌ای می‌باشد و پراکندگی خوب و یکنواخت نانو ذرات را بر سطح الکتروود نمایش می‌دهد. اندازه نانو ذرات بر سطح الکتروود زیر ۱۰۰ نانومتر تخمین زده می‌شود. به دلیل مساحت سطح بالا و یکنواختی خوب، سطح الکتروود حاصله پتانسیل بالایی برای جذب آنالیت و افزایش جریان حاصله را داراست.



شکل ۲- تصویر SEM مربوط به الکترود اصلاح شده با CNPs/CNFs

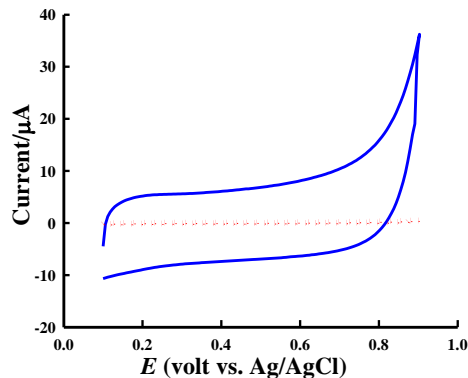
### ۳-۳- مطالعات الکتروشیمیایی فولیک اسید با استفاده از CNP/CNFs/GCE

رفتار الکتروشیمیایی محلول ۱۰ میکرو مولار فولیک اسید در سطح CNP/CNFs/GCE و GCE توسط روبش ولتامتری چرخه‌ای، ثبت شده در محلول بافر فسفات (pH=۲/۵) پس از ۱۰۰ ثانیه پیش تغلیظ تحت مدار باز با سرعت روبش پتانسیل ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه، بررسی شد (شکل ۳).



شکل ۳- ولتاموگرام‌های چرخه‌ای محلول بافری فولیک اسید (۱۰ μM، pH=۲/۵) بر روی الکترودهای (a) کربن شیشه‌ای اصلاح شده و (b) کربن شیشه‌ای برهنه.

همانطور که مشاهده می‌شود، در سطح الکترود اصلاح نشده پاسخی ضیف برای اکسایش فولیک اسید حاصل می‌گردد در حالیکه در سطح الکترود اصلاح شده بهبود چشمگیر در جریان پیک اکسایش فولیک اسید مشاهده شد که بیانگر تاثیر مثبت ترکیب اصلاحگر در بهبود پاسخ می‌باشد. با توجه به جابه‌جائی اندک پیک آندی در سطح الکترود اصلاح شده نسبت به الکترود عریان، افزایش چشمگیر مشاهده شده در پاسخ ولتامتری به افزایش سطح موثر الکترود و جذب موثر ملکول‌های فولیک اسید بر سطح الکترود اصلاح شده با نانو ذرات کربنی نسبت داده می‌شود.

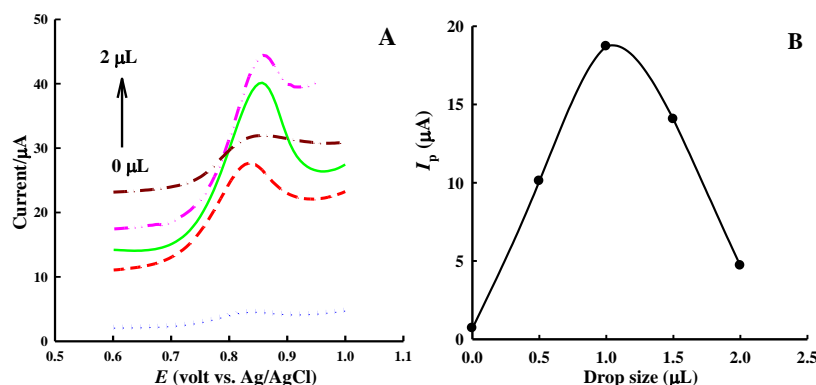


شکل ۴- ولتاموگرامهای چرخه‌ای الکترودهای (خط پر) کربن شیشه‌ای اصلاح شده و (نقطه چین) کربن شیشه‌ای برهنه درون محلول بافری فسفات (pH=۲/۵).

همچنین سطح موثر الکتروود کربن شیشه‌ای برهنه با الکتروود اصلاح شده CNFs/CNPs به کمک ثبت ولتاموگرام چرخه‌ای در محلول بافر فسفات (pH=۲/۵) در سرعت اسکن ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه مقایسه شد (شکل ۴). افزایش جریان خازنی در نتیجه اصلاح سطح الکتروود به وضوح افزایش سطح موثر الکتروود را نشان می‌دهد.

#### ۳-۴- تاثیر رشته‌های سلولز و بهینه سازی مقدار اصلاحگر استفاده شده

در مقایسه با سوسپانسیون آبی نانو ذرات کربنی، سوسپانسیون CNPs/CNFs پایدارتر می‌باشد. از طرفی لایه نشانده شده از این اصلاحگر چسبندگی بهتری نسبت به سطح GCE دارد و موجب پایداری بهتر الکتروود اصلاح شده و تکرارپذیری طولانی مدت پاسخ‌های حاصله می‌گردد. به عبارت دیگر، بافت CNPs/CNFs نه تنها انتقال الکترون بین گونه‌های فعال اکسایش- کاهش و الکتروود را بهبود می‌بخشد بلکه نقص غشای ناپایدار را نیز با بهبود پایداری الکتروود اصلاح شده، به دلیل توانایی بالای تشکیل لایه پایدار برطرف می‌سازد. مشاهده شده است که در هنگام اصلاح سطح الکتروود، با قطره‌گذاری سوسپانسیون اصلاحگر بر سطح الکتروود، ضخامت فیلم اصلاحگر توانایی تغییر سنتیک فرآیندهای الکتروودی را دارد. همچنین مکانیسم انتقال جرم نسبت به نفوذ درون لایه‌ی اصلاحگر ممکن است با تغییر ضخامت دستخوش تغییر شود. متعاقباً پاسخ الکتروود نسبت به گونه‌های آنالیت نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد. ضخامت فیلم توسط اصلاح الکتروود با حجم‌های متفاوت از اصلاحگر CNFs/CNPs با غلظت یکسان مورد مطالعه قرار گرفت.

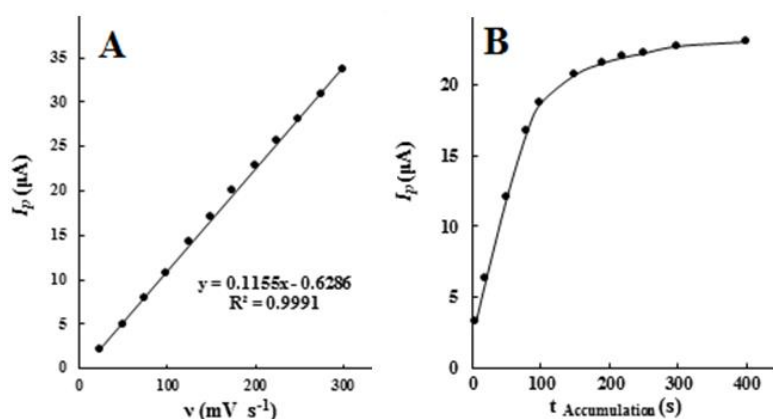


شکل ۵- (A) ولتاموگرام‌های پالسی تفاضلی محلول  $10 \mu\text{M}$  از فولیک اسید بافری شده در سطح GCE پوشیده شده با حجم‌های مختلفی از سوسپانسیون CNFs/CNPs. (B) نمودار جریان پیک اکسایشی برحسب حجم سوسپانسیون اصلاح کننده.

نتایج نشان داد که جریان پیک اکسایش برای محلول  $10 \mu\text{M}$  میکرومولار فولیک اسید با افزایش حجم اصلاحگر تا  $1/0$  میکرولیتر افزایش می‌یابد. در اینجا افزایش بیشتر حجم سوسپانسیون CNFs/CNPs باعث کاهش تدریجی پاسخ الکتروود و افزایش جریان زمینه می‌شود (شکل ۵). این رفتار می‌تواند به دلیل افزایش مقاومت سطح الکتروود نسبت به انتقال الکترون و کندی فرآیند انتقال جرم فولیک اسید، در مقابل ضخامت بالای فیلم نشسته شده بر سطح الکتروود کربن شیشه باشد. بنابراین حجم  $1/0$  میکرولیتر از سوسپانسیون CNFs/CNPs به عنوان حجم بهینه برای اصلاح سطح الکتروود انتخاب شد.

### ۳-۵- اثر سرعت روبش پتانسیل

اطلاعات مفیدی از جمله مکانسیم واکنش الکتروشیمیایی معمولاً با بررسی ولتامتری چرخه‌ای در سرعت‌های روبش پتانسیل مختلف قابل دستیابی می‌باشد. بنابراین، بررسی ولتامتری چرخه‌ای محلول بافری  $10 \mu\text{M}$  میکرومولار از فولیک اسید با  $\text{pH}=2/5$  در سطح الکتروود CNFs/CNPs/GC در سرعت‌های روبش پتانسیل مختلف انجام شد.



شکل ۶- (A) نمودار جریان پیک آندی (B) محلول  $10 \mu\text{M}$  میکرومولار از فولیک اسید برحسب سرعت روبش پتانسیل (B) محلول  $10 \mu\text{M}$  فولیک اسید در مقابل زمان پیش تغلیظ، در سطح CNFs/CNPs/GCE در بافر  $0.1 \text{ M}$  فسفات  $\text{pH}=2/5$ .



شکل ۶A اثر سرعت روبش پتانسیل را بر ولتاموگرامهای فولیک اسید در گستره ۲۵ الی  $300 \text{ mVs}^{-1}$  نشان می‌دهد. نمودار جریان پیک آندی فولیک اسید برحسب سرعت روبش پتانسیل خطی با شیب  $0/116$  را نشان می‌دهد که بیانگر این مطلب است که فرایند الکترواکسایش فولیک اسید در سطح الکتروکترود CNFs/CNPs/GC تحت کنترل جذب سطحی می‌باشد.

$$I_{pa} = 0/1155 v + 0/6286 \quad (R^2=0/9991, I_{pa}: \mu A, v: \text{mVs}^{-1}) \quad (1)$$

ارتباط بین پتانسیل پیک آندی و سرعت روبش پتانسیل نیز بررسی شد. مشاهده شد که پتانسیل پیک آندی با افزایش سرعت روبش پتانسیل به سمت مقادیر مثبت‌تر جابه‌جا می‌شود. بین پتانسیل پیک آندی با لگاریتم سرعت روبش پتانسیل رابطه خطی برقرار است. بعلاوه، حتی در سرعت‌های روبش پتانسیل بالا هم فقط یک پیک آندی (بدون پیک برگشت کاتدی مربوطه) مشاهده شد که چنین رفتاری موید فرایند کاملاً برگشت‌ناپذیر اکسایش الکتروشیمیایی فولیک اسید می‌باشد.

### ۳-۶- تأثیر زمان پیش تغلیظ

ولتامتری چرخه‌ای متوالی از محلول فولیک اسید در سطح الکتروکترود کربن شیشه‌ای اصلاح شده با لایه CNPs/CNFs انجام بخش عمده‌ای از افزایش قابل توجه جریان پیک الکترو اکسایش فولیک اسید در سطح الکتروکترود اصلاح شده به توانایی جذب قوی آن بر روی فیلم CNPs/CNFs در سطح GCE نسبت داده می‌شود. زمانی که واکنش تحت تأثیر جذب سطحی می‌باشد، تنظیم زمان پیش تغلیظ از اهمیت خاصی برخوردار است. اندازه‌گیری با پیش تغلیظ تحت مدار باز و هم زدن یکنواخت محلول به مدت معین و سپس اعمال پله پتانسیل روبش ولتامتری چرخه‌ای بعد از ۱۰ ثانیه سکون انجام گرفت. مطابق با شکل ۶B زمان پیش تغلیظ نقش مهمی در پاسخ ولتامتری دارد. جریان پیک آندی با افزایش زمان تا ۱۰۰ ثانیه، افزایش سریع یافته، درحالی‌که با افزایش بیشتر زمان پیش تغلیظ تغییر بسیار کمی در جریان پیک آندی مشاهده می‌شود. همچنین اثر شرایط پیش تغلیظ بر تکرارپذیری نتایج حاصله بررسی شد و مشاهده گردید که در زمان پیش تغلیظ پایین تکرارپذیری ضعیف می‌باشد، اما در زمانهای بیشتر از ۱۰۰ ثانیه ولتاموگرامهایی با تکرارپذیری خوب بدست می‌آید. با توجه به نتایج حاصله، زمان پیش تغلیظ ۱۰۰ ثانیه همراه با هم زدن یکنواخت محلول نمونه تحت مدار باز به عنوان شرایط بهینه جهت دستیابی به حساسیت بیشتر و تکرار پذیری بالا در اندازه‌گیری کمی، در ادامه کار اعمال گردید.

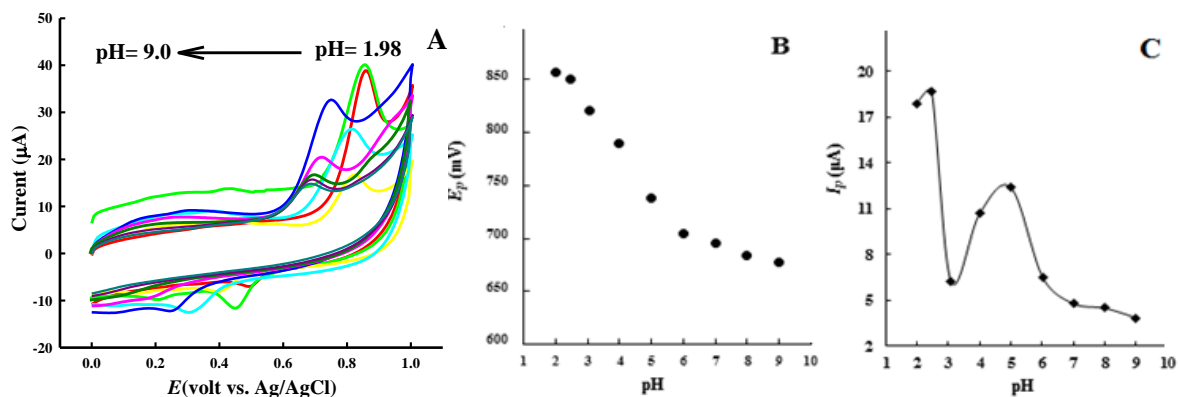
### ۳-۷- تأثیر pH

pH الکتروولیت حامل تأثیر قابل توجهی در اکسایش الکتروشیمیایی فولیک اسید در سطح CNFs/CNPs/GCE دارا می‌باشد. به منظور بهینه کردن شرایط آزمایش اندازه‌گیری فولیک اسید، الکترواکسایش فولیک اسید در گستره pH برابر با ۱/۹۸ الی ۹/۰ در محلول بافری فسفات بررسی شد. با توجه به شکل ۷، با افزایش pH، پتانسیل پیک آندی به سمت

پتانسیل‌های منفی‌تر جا به جا می‌شود. نمودار پتانسیل پیک آندی در مقابل pH در گستره pH بین ۲ الی ۶، خطی با معادله ۲ را نشان می‌دهد.

$$E_{p,a} = -41/4 \text{pH} + 951/3 \text{ (mV vs. Ag/AgCl)} \quad (R^2 = 0.9946) \quad (2)$$

با توجه به شیب نمودار حاصله مشخص است که تعداد پروتون‌های شرکت کننده در واکنش اکسایش الکتروشیمیایی فولیک اسید نصف تعداد الکترون‌ها می‌باشد. همچنین اثر pH بر جریان پیک آندی مورد بررسی قرار گرفت. جریان پیک آندی با افزایش pH از ۲/۵ الی ۹ مطابق با شکل C-۷ کاهش یافت. در نتیجه محلول بافری با pH=۲/۵ به عنوان الکترولیت حامل برای ادامه کار در نظر گرفته شد.



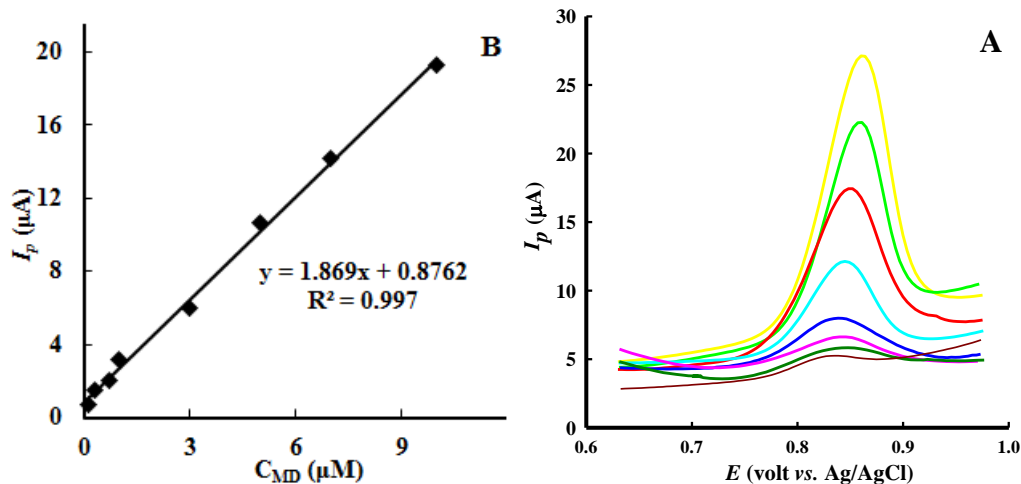
شکل ۷- (A) ولتاموگرام‌های چرخه‌ای محلول‌های ۱۰ میکرومولار از فولیک اسید بافری شده در pHهای مختلف در سطح CNPs/CNFs/GCE، در سرعت روبش پتانسیل ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه (B) نمودار تغییرات پتانسیل پیک اکسایش برحسب pH (C) نمودار تغییرات جریان پیک اکسایش برحسب pH.

### ۳-۸- تعیین کمی فولیک اسید با استفاده از روش ولتامتری پالسی تفاضلی و رسم منحنی درجه بندی

تحت شرایط بهینه، اندازه‌گیری کمی فولیک اسید توسط روش ولتامتری پالسی تفاضلی با استفاده از الکتروود CNPs/CNFs/GC انجام گرفت. شکل ۸- A ولتاموگرام‌های حاصله را نمایش می‌دهد. نمودار جریان پیک اکسایش بر حسب غلظت را در گستره غلظتی ۰/۱ - ۱۰ میکرو مولار (شکل ۸- B) نشان می‌دهد. رابطه خطی منحنی کالیبراسیون مطابق با معادله (۳) بدست آمد:

$$I_{p,a}(\mu A) = 1/869C(\mu M) + 0.1876 \quad (R^2 = 0.997) \quad (3)$$

بعد از هر اندازه‌گیری، جهت تمیز کردن سطح، الکتروود اصلاح شده درون محلول بافر قرار داده شد و روبش ولتامتری چرخه‌ای پی در پی (حداقل ۳ مرتبه) در گستره پتانسیل ۰/۲ - تا ۱/۰ ولت اعمال گردید.



شکل ۸- (A) ولتاموگرام‌های پالسی تفاضلی محلول‌های حاوی غلظت‌های مختلف فولیک اسید (در گستره ۰/۱ تا ۱۰ میکرومولار) در بافر ۰/۱ M فسفات ۲/۵. (B) منحنی کالیبراسیون خطی جریان پیک آندی بر حسب غلظت فولیک اسید

### ۳-۹- تکرارپذیری، پایداری و تکثیرپذیری الکتروود اصلاح شده

تکثیرپذیری و تکرارپذیری دو فاکتور بسیار با اهمیت برای ارزیابی کارایی یک حسگر می‌باشند. برای بررسی تکرارپذیری پاسخ الکتروود اصلاح شده، ۵ مرتبه اندازه‌گیری متوالی محلول ۱ میکرو مولار از فولیک اسید انجام شد و مقدار انحراف استاندارد نسبی حاصله برابر با ۳/۲ درصد بدست آمد که بیانگر تکرارپذیری عالی پاسخ الکتروود اصلاح شده می‌باشد. همچنین با کاربرد روزانه الکتروود اصلاح شده جهت اندازه‌گیری محلول ۱ میکرو مولار از فولیک اسید و نگهداری الکتروود تحت شرایط محیطی به مدت ۱ هفته، پاسخ الکتروود در حد ۹۶/۳٪ پاسخ اولیه آن حفظ شد که نشانگر پایداری طولانی مدت لایه اصلاحگر بر روی سطح GCE می‌باشد. همچنین جهت بررسی تکثیرپذیری فرایند تهیه الکتروود اصلاح شده، ۳ الکتروود اصلاح شده به طور مجزا تهیه و اندازه‌گیری ولتامتری پالسی تفاضلی محلول ۱ میکرو مولار از فولیک اسید توسط آنها انجام شد که مقدار انحراف استاندارد نسبی در پاسخ حاصله برابر با ۵/۶ درصد بدست آمد. نتایج بیانگر تکرارپذیری و تکثیرپذیری بسیار خوب الکتروود اصلاح شده، هم در روش تهیه الکتروود و هم برای اندازه‌گیری‌های ولتامتری با پایداری طولانی مدت، می‌باشند.

### ۳-۱۰- مطالعه مزاحمت‌ها

تاثیر حضور برخی ترکیب‌های مزاحم مانند گلوکز، آسکوربیک اسید، اوریک اسید، دوپامین و برخی یون‌های فلزی مانند پتاسیم، کلسیم، سدیم که پتانسیل مزاحمت در صحت اندازه‌گیری فولیک اسید را دارند، در سطح الکتروود اصلاح شده تحت شرایط بهینه مطالعه شد. عدم مشاهده پاسخ ولتامتری برخی گونه‌ها و تفکیک کامل پیک اکسایشی فولیک اسید از گونه‌های آلی مذکور، و نیز عدم تغییر در جریان پیک آندی مربوط به فولیک اسید در حضور این ترکیبات، گواه بر عدم ایجاد مزاحمت این

گونه‌ها در اندازه‌گیری فولیک اسید می‌باشد. نتایج نشان داد که می‌توان الکتروده تهیه شده را به طور موفقیت آمیز برای اندازه‌گیری فولیک اسید در حضور ترکیبات مزاحم مهم در نمونه‌های کلینیکی به کار برد.

مقایسه ویژگی‌های الکتروشیمیایی الکتروده تهیه شده در کار حاضر با نتایج مقالاتی که قبلاً منتشر شده اند، برای اندازه‌گیری فولیک اسید در جدول ۱ آورده شده است [۲۶-۳۲]. جمالی و همکارانش الکتروده خمیر کربن اصلاح شده‌ای را با استفاده از آلیاژ پلاتین - کبالت همراه با مابع یونی n-هگزیل-۳-متیل ایمیدازولیوم هگزا فلئوروفسفات تهیه کردند و برای اندازه‌گیری فولیک اسید در نمونه‌های آبی به کار بردند [۲۶]. در این کار اندازه‌گیری در بافر فسفات با pH=۹ با استفاده از تکنیک ولتامتری موج مربعی انجام شد. طاهرخانی و همکارانش اندازه‌گیری فولیک اسید را با کمک الکتروده خمیر کربن اصلاح شده با نانو ذرات اکسید روی انجام دادند [۲۷]. در این کار نیز از تکنیک ولتامتری موج مربعی برای اندازه‌گیری فولیک اسید در بافر فسفات با pH=۹ استفاده شده است. نانو ذرات اکسید روی خواص الکترو کاتالیزوری خوبی نسبت به اکسایش فولیک اسید نشان دادند. همچنین چندین الکتروده اصلاح شده دیگر برای اندازه‌گیری فولیک اسید توسعه داده شده است که در جدول ۱ ذکر شده‌اند. اگرچه گستره خطی و حد تشخیص الکتروده اصلاح شده در این کار به خوبی برخی مقالات مذکور نیست، روش آسان و سریع تهیه الکتروده اصلاح شده، پایداری بالای آن و صحت خوب نتایج حاصله از آنالیز نمونه‌های قرص فولیک اسید، کارایی خوب و قابل قبول CNFs/CNPs/GCE را بیان می‌کند. از طرفی قیمت پایین سیستم معرفی شده فاکتور مهم دیگری است که باید بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

جدول ۱. مقایسه کارایی الکترودهای مختلف برای اندازه‌گیری فولیک اسید

الکتروده	گستره خطی ( $\mu\text{M}$ )	حد تشخیص ( $\mu\text{M}$ )	مرجع
Pt:Co/IL/CPE	۰/۱ - ۵۰۰	۰/۰۴	[۲۶]
ZnONPs/IL/CPE	۰/۰۵ - ۵۵۰	۰/۰۱	[۲۷]
SWCNT/IL/GCE	۰/۰۰۲ - ۱	۰/۰۰۱	[۲۸]
Bismuth nanowires/GCE	۰/۱۵ - ۰/۰۱	$\approx$ ۰/۰۱	[۲۹]
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /CPE	۰/۰۶۵ - ۹۸	۰/۰۰۲	[۳۰]
FDC <sup>a</sup> -MWCNT/CPE	۴/۶ - ۱۵۲	۱/۱	[۳۱]
HANPs/GCE	۰/۱ - ۳۵۰	۰/۰۷۵	[۳۲]
CNPs/CNFs/GCE	۰/۱ - ۱۰	۰/۰۳	کار حاضر

<sup>a</sup> Ferrocenedicarboxylic acid    <sup>b</sup>Hydroxyapatite nano particles

### ۳-۱۱- کاربرد تجزیه‌ای: ارزیابی صحت روش باندازه‌گیری فولیک اسید در نمونه دارویی

برای بررسی قابلیت کاربرد روش پیشنهاد شده در اندازه‌گیری‌های فارماکولوژی، CNPs/CNFs/GCE برای اندازه‌گیری مقادیر کم فولیک اسید در قرص‌های فولیک اسید، با به کارگیری تکنیک پالسی تفاضلی، مورد استفاده قرار گرفت. ۵ عدد قرص با (۱ میلی گرم فولیک اسید در هر قرص) به دقت توزین شد، سپس به طور یکنواخت در هاون عقیق به پودر تبدیل گردید. قسمتی از ماده با دقت توزین شد و در ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۲/۵ در بالن ژوژه ۱۰ mL حل شد تا محلول ۱۰ میکرومولار از فولیک اسید حاصل گردد. سپس محلول ۰/۵ میکرومولار بوسیله رقیق کردن مقدار لازم از محلول مذکور بدست آمد. برای بدست آوردن مقدار واقعی فولیک اسید در نمونه قرص و درصد بازیابی، از روش افزایش استاندارد استفاده شد. برای این منظور مقادیر ۵ میلی لیتری از محلول حاصله به بالن ژوژه‌های ۲۵ میلی لیتری منتقل شد و مقادیر لازم از محلول مادر فولیک اسید استاندارد به آنها، جهت دستیابی به غلظت فولیک اسید استاندارد در گستره ۰/۵ تا ۱ میکرو مولار، افزوده شد. گستره خطی و شیب منحنی کالیبراسیون روش افزایش استاندارد جهت ارزیابی درصد بازیابی روش ارائه شده بکار برده شدند. با استفاده از نتایج آزمایش افزایش استاندارد، محتوی فولیک اسید ۰/۹۳ میلی گرم در ازای هر قرص (RSD=۴/۶٪) در ازای ۳ بار اندازه‌گیری) بدست آمد، که بسیار نزدیک به مقدار برچسب روی قرص (۱ میلی‌گرم) بر قرص می‌باشد.

### ۴-نتیجه‌گیری

در این پژوهش، سوسپانسیون CNFs/CNPs جهت ساخت یک حسگر الکتروشیمیایی حساس جدید بکار برده شد. الکتروود اصلاح شده مزایای الکتروشیمیایی قابل ذکرمانند صحت بالا، تکرارپذیری و تکثیرپذیری خوب و ناحیه دینامیکی خطی گسترده را نشان داد. نتایج بررسی‌های الکتروشیمیایی نشان داد CNFs/CNPs مساحت سطح الکتروفعال را افزایش داده و موجب افزایش قابل توجه جریان پیک اکسایش فولیک اسید می‌گردد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت این حسگر دارای قابلیت‌های زیادی برای تعیین دقیق فولیک اسید در نمونه‌های دارویی و کلینیکی می‌باشد.

### ۵-تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی طبق قرارداد شماره ۳۲۵۵۴ مورخ ۱۳۹۲/۱۱/۲۰ انجام گردیده است.

### ۶-مراجع:

- [1] A.L. Lehninger, Principles of Biochemistry, Worth, New York (1982).
- [2] F.J. Al-Shammery, K.A. Al-Rashood, N.A. Mian, M.S. Mian, *Analytical Profiles of Drug Substances*, **19**(1990) 221.
- [3] S. Wei, F. Zhao, Z. Xu, B. Zeng, *Microchim. Acta* **152** (2006) 285.

- [4] H. Beitollahi, M. Mazloum Ardakani, B. Ganjipour, H. Naeimi, *Biosens. Bioelectron.* **24** (2008) 362.
- [5] A.C.L. Gall, C.M.G. Van den Berg, *Anal. Chim. Acta* **282** (1993) 459.
- [6] D. Manoj, D.R. Kumar, J. Santhanalakshmi, *Appl. Nanosci.* **2** (2012) 223.
- [7] R.Z. Stolzenberg-Solomon, S.C. Chang, M.F. Leitzmann, K.A. Johnson, C. Johnson, S.S. Buys, R.N. Hoover, R.G. Ziegler, *Am. J. Clin. Nutr.* **83** (2006) 895.
- [8] A.A. Warthan, *Anal. Sci.* **10** (1994) 919.
- [9] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* **351** (1997) 223.
- [10] M.W. Dong, J. Lepore, T. Tarumoto, *J. Chromatogr. A* **442** (1988) 81.
- [11] R.H.F. Chenug, P.D. Morrison, D.M. Small, P.J. Marriott, *J. Chromatogr. A* **1213** (2008) 93.
- [12] R. Amidzic, J. Abrboric, O. Cudina, S. Vladimirov, *J. Serb. Chem. Soc.* **70** (2005) 1229.
- [13] B.C. Nelson, K.E. Sharpless, L.C. Sander, *J. Chromatogr. A* **1135** (2006) 203.
- [14] L. Mirmoghtadaie, A.A. Ensafi, M. Kadivar, P. Norouzi, *Mater. Sci. Eng. C* **33** (2013) 1753.
- [15] A.A. Ensafi, H. Karimi-Maleh, *J. Electroanal. Chem.* **640** (2010) 75.
- [16] L. Bandzuchova, R. Selesovska, T. Navratil, J. Chylkova, *Electrochim. Acta* **56** (2011) 2411.
- [17] V.D. Vaze, A.K. Srivastava, *Electrochim. Acta* **53** (2007) 1713.
- [18] S. Wei, F. Zhao, Z. Xu, B. Zeng, *Microchim. Acta* **152** (2006) 285.
- [19] P. Kalimuthu, S.A. John, *Biosens. Bioelectron.* **24** (2009) 3575.
- [20] H. Beitollahi, M.M. Ardakani, B. Ganjipour, H. Naeimi, *Biosens. Bioelectron.* **24** (2008) 362.
- [21] B.B. Prasad, R. Madhuri, M.P. Tiwari, P.S. Sharma, *Sens. Actuators B* **146** (2010) 321.
- [22] M. Mazloum-Ardakani, H. Beitollahi, M.K. Amini, F. Mirkhalaf, M. Abdollahi-Alibeik, *Sens. Actuators, B* **151** (2010) 243.
- [23] N.A. El Maali, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **27** (1992) 465.
- [24] H. Zhang, J. Zhang, J. Zheng, *Measurement* **59** (2015) 177.
- [25] م. امیری، ف. رضاپور، ا. بضاعت پور، مجله علمی - پژوهشی شیمی کاربردی - ۲۶ (۱۳۹۲) ۹۳.
- [26] T. Jamali, H. Karimi-Maleh, M.A. Khalilzadeh, *LWT - Food Sci. Technol.* **57** (2014) 679.
- [27] A. Taherkhani, T. Jamali, H. Hadadzadeh, H. Karimi-Maleh, H. Beitollahi, M. Taghavi, F. Karimi, *Ionics* **20** (2014) 421.
- [28] F. Xiao, C. Ruan, L. Liu, R. Yan, F. Zhao, B. Zeng, *Sens. Actuators B* **134** (2008) 895.
- [29] A. Ananthi, S.S. Kumar, K.L. Phani, *Electrochim. Acta* **151** (2015) 584.
- [30] M. P. Kingsley, P.B. Desai, A.K. Srivastava, *J. Electroanal. Chem.* **741** (2015) 71.
- [31] Ali A. Ensafi, H. Karimi-Maleh, *J. Electroanal. Chem.* **640** (2010) 75.
- [32] P. Kanchana, C. Sekar, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **137** (2015) 58.