استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به آشکارساز فرابنفش برای سنجش آمینواسیدهای آزاد در نمونه‌های خاک و کود

بهمن احمدی عبد[۱]، کبرا سادات هاشمی نسب*[۲]، محمود پایه قدر[۱]، کریم شهبازی[۲]

[۱]گروه شیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

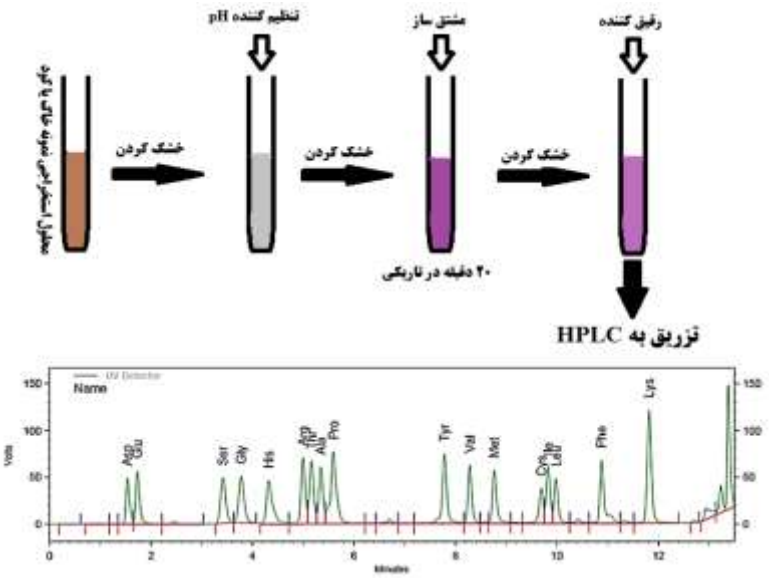
[۲]موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۰۹ تاریخ تصحیح:۹۹/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش:۹۹/۱۰/۲۰

چکیده

در این پژوهش غلظت آمینواسیدهای آزاد مؤثر در متابولیسم گیاهی، در نمونه‌های مختلف خاک و کود به روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به آشکارساز فرابنفش اندازه‌گیری شد. ابتدا آمینواسیدها با هیدروکلریک اسید ۰/۱ نرمال استخراج شدند. سپس با فنیل ایزوتیوسیانات (PITC) مشتق‌سازی شد. در نهایت، مشتقات فنیل تیوکاربامیل-آمینواسید در ستون فاز معکوس با استفاده از شویش گرادیانی با بافر سدیم استات تری‌هیدرات و استونیتریل-آب (۴۰:۶۰ [حجمی/حجمی]) جداسازی، و توسط آشکارساز UV در طول موج ۲۵۴ نانومتر آشکارسازی شد. چندین پارامتر موثر بر جداسازی پیک آمینواسیدها از جمله pH و دمای فاز متحرک، غلظت بافر و اصلاح کننده (تری اتیل آمین) در فاز متحرک مورد مطالعه قرار گرفتند. با تغییر هر یک از شرایط موجود میزان تفکیک هر یک از آمینواسیدها بهینه‌سازی شد. تحت شرایط بهینه، گستره خطی خوبی در محدوده خطی ۱۲۵/۰ – mol/ml μ ۰/۰۳۱۲ برای ۱۷ آمینواسید با حدّ تشخیص ۰۰۹۴/۰mol/ml μ و تکرار پذیری قابل قبولی برای هر یک از آمینواسیدها به دست آمد (RSD ۶/۱٪ ≤). در نهایت با این روش درصد آمینواسیدهای آزاد در نمونه‌های مختلف خاک و کود اندازه‌گیری شد.

کلمات کلیدی: آمینواسیدهای آزاد، *کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به آشکارساز فرابنفش*، فنیل ایزوتیوسیانات، خاک، کود.



چکیده تصویری

* **نویسنده مسئول:** استادیار شیمی تجزیه موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران k.hasheminasab@areeo.ac.ir

۱- مقدمه

استفاده از آمینواسیدها در طول رشد گیاه یکی از روش‌های شناخته شده برای افزایش عملکرد و کیفیت محصول بوده و علاوه بر آن، ممکن است آمینواسیدها با عناصر کمیاب، کلات تشکیل داده که می‌تواند باکتری‌ها و حشرات را از بین برده و باقیمانده سموم را کاهش دهد. معمولاً کودها با پایه آمینواسید برای استفاده در طول مراحل بحرانی رشد، بعد از نشاء، در طول دوره گل‌دهی و در استرس‌های اقلیمی توصیه می‌شوند. آنها بخصوص در زمانی‌که در ترکیب با عناصر میکرو استفاده می‌شوند، بدلیل تشکیل کلات که بیشتر قابل استفاده هستند، موثرند [۱]. وجود آمینواسیدها در خاک می‌تواند باعث بهبود و تقویت میکروفلورای خاک شده که این موجودات می‌توانند عامل مهمی در تسهیل جذب عناصر توسط ریشه گیاه باشند. در اکثر مزارع و باغات کشور محدودیت‌های مختلف تغذیه‌ای وجود دارد، احتمال می‌رود که جذب عناصر ماکرو و میکرو توسط گیاه بخوبی انجام نمی‌پذیرد، شاید یکی از دلایل اصلی عدم کیفیت محصولات کشاورزی و کاهش عملکرد آنها، عدم امکان عملی اندازه‌گیری غلظت آمینواسیدها و کنترل نسبت آنها با سایر عناصر غذایی در زمان‌های مناسب باشد. از همین رو بسیاری از کارشناسان و متخصصان در کشاورزی معتقدند که استفاده توامان کودهای کامل با کودهایی که حاوی کلیه آمینواسیدهای مورد نیاز گیاه هستند می‌تواند تأثیرات بسیار چشمگیری روی عملکرد و خصوصیات کیفی محصول داشته باشد [۲]. با توجه به این تقاضاها و نیاز به کنترل کودهای حاوی آمینواسید مصرفی در کشاورزی و جلوگیری از عرضه کودهای تقلبی که درصدهای غیر واقعی را به بازار عرضه می‌کنند، لازم است روشی کارآمد برای تعیین غلظت آمینواسیدها در نمونه‌های کود در آزمایشگاه انجام شود. از طرف دیگر با بررسی آمینواسیدها در نمونه خاک کشاورزی مطالعات روی تاثیر و میزان جذب آمینواسیدها توسط گیاه میسر خواهد بود.

تکنیک‌های بسیاری برای اندازه‌گیری غلظت آمینواسیدهای آزاد وجود دارد، که می‌توان کروماتوگرافی لایه نازک، الکتروفورز موییـنه‌ای، کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا را نام برد [۳-۸]. در سال‌های اخیر، روش‌های استفاده از مشتق‌سازی پیش‌ستونی آمینواسیدها، با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) با فاز معکوس (RP) اهمیّت بیشتری را به دست آورده است و تا اندازه‌ای جایگزین آنالیز آمینواسیدها به روش‌های کلاسیک شده است . تحقیقات، مفید بودن این روش را برای تعیین آمینواسیدها در مایعات فیزیولوژیکی نشان می‌دهد و همچنین نتایج حاصل از روش‌های HPLC در مقایسه با نتایج آنالایزر آمینواسید مطلوب است. در مقایسه با مشتق‌ساز پس‌ستونی و آنالیز آمینواسیدها توسط کروماتوگرافی مبادله یونی، مشتق‌سازی پیش‌ستونی و روش‌های HPLC از مزایایی همچون کاهش زمان آنالیز، افزایش حساسیت و انعطاف‌پذیری و کاهش هزینه‌های ابزار و نگهداری برخوردار است [۹].

در این پژوهش، روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و آشکارگر فرابنفش برای تعیین غلظت آمینواسیدهای آزاد در نمونه‌های مختلف خاک و کود بهینه‌سازی گردید. چندین پارامتر موثر روی جداسازی پیک‌ها از جمله pH، دمای فاز متحرک، غلظت تری

اتیل آمین (TEA) و غلظت بافر در فاز متحرک در نظر گرفته و بهینه سازی آن‌ها را انجام دادیم. علاوه بر این، ویژگی‌های آماری روش مانند حد تشخیص، دامنه خطی، قابلیت تکرارپذیری و درصد بازیابی نیز مورد بررسی قرار گرفت. سپس میزان آمینواسیدهای آزاد در چندین نمونه خاک و کود پس از استخراج و مشتق سازی با واکنشگر فنیل ایزوتیوسیانات با روش HPLC تعیین شدند.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی و استانداردها

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده دارای درجه خلوص تجزیه‌ای بودند. فنیل ایزوتیوسیانات (PITC) و تری اتیل آمین (TEA) از شرکت سیگما خریداری شدند. هیدروکلریک اسید و استونیتریل (خلوص HPLC) و اتانول (۹۹ درصد) از شرکت مرک خریداری شدند. آب دوبار تقطیر دیونیزه برای محلول‌سازی و تهیه فاز متحرک استفاده گردید.

استاندارد آمینواسیدها شامل آمپول یک میلی‌لیتری (Termo scientific, USA) است که حاوی ۲/۵ میکرومول/ میلی‌لیتر از هر آمینواسید در هیدروکلریک اسید ۰/۱ نرمال است که شامل: آسپارتیک اسید (L-aspartic acid)، گلوتامیک اسید (L-glutamic acid)، سرین (L-serine)، گلایسین (L-glycine)، هیستیدین (L-histidine)، آرژنین (L-arginine)، ترونین (L-threonine)، آلانین (L-alanine)، پرولین (L-proline)، تیروسین (L-tyrosine)، والین (L-valine)، متیونین (L-methionine)، سیستئین (L-cysteine) (۱/۲۵ میکرومول/ میلی‌لیتر)، ایزولوسین (L- ileucine)، لوسین (L-leucine)، فنیل‌آلانین (L-phenylalanine) و لیسین (L-lysine) است. این استاندارد در دمای ۴°C- نگهداری شد.

۲-۲- نمونه‌ها

چندین نمونه خاک کشاورزی از مناطق مختلف ایران برای آنالیز انتخاب و جمع‌آوری شدند. کودهای مورد آنالیز شامل کودهای شیمیایی و آلی ارسال شده به موسسه تحقیقات خاک و آب ایران برای آنالیز کمّی آمینواسیدها بودند.

۲-۳- تجهیزات

دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) مورد استفاده KNAUER مدل EuroChrom ساخت کشور آلمان مجهز به پمپ چهار کاناله مدل K-۱۰۰۱ و آشکارساز UV-Vis و Degasser مدل K-۲۶۰۰ بود. جداسازی‌ها در ستون C_{18} مخصوص آنالیز آمینواسیدها با نام Pico-Tag (L=150 mm, ID=3.9 mm) از شرکت Waters انجام شد. حجم تزریقی 20 µL و دمای ستون ۳۸ °C بود. همچنین سرعت جریان فاز متحرک ml/min ۱ بود.

از پمپ خلا برای حلال پرانی و از فیلتر سرسرنگی (FRISENETTE-PVDF, Denmark) با اندازه منفذ ۰/۴۵ برای صاف کردن محلول‌ها استفاده گردید.

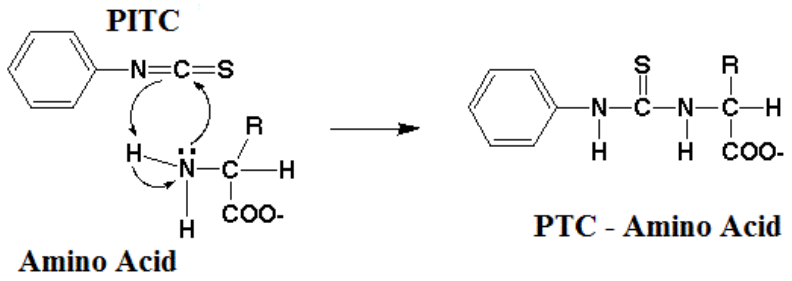
۲-۴- آماده‌سازی نمونه‌ها

برای آماده سازی نمونه خاک کوبیده شده و سنگریزه‌های درشت (قطر بیش از cm ۲) برداشته شد. سپس ۴ گرم از نمونه خاک را با ۲۰ میلی لیتر محلول ۰/۱ نرمال هیدروکلریک‌اسید مخلوط کرده و به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۲۰۰ هم میزنیم. پس از سانتریفیوژ محلول رویی را به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده و سپس با فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرون فیلتر شد. سپس در ظروف پلی اتیلنی در فریزر نگه‌داری شد [۱۰].

برای نمونه کود جامد، ۰/۴ گرم از نمونه به بالن ۲۵ میلی‌لیتری منتقل شد. تا حدود سه چهارم از حجم بالن، محلول ۰/۱ نرمال هیدروکلریک‌اسید ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه هم زده شد. سپس به حجم رسانده و محتویات آن با فیلتر سرسرنگی فیلتر شد. برای آماده‌سازی نمونه کود مایع، در یک بالن ۲۵ میلی‌لیتری ۲ میلی‌لیتر از نمونه به بالن انتقال داده شد و حدود دو سوم حجم بالن، محلول ۰/۱ نرمال هیدروکلریک‌اسید به آن اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه هم زده شد. سپس به حجم رسانده و محتویات آن با فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرون فیلتر شد.

۲-۵- مشتق‌سازی با فنیل ایزوتیوسیانات

از واکنشگرهای مشتق‌ساز زیادی برای تعیین آمینواسیدها با HPLC استفاده شده است. ما واکنشگر PITC را برای مشتق‌سازی انتخاب کردیم. زیرا PITC با آمینواسیدها مشتقات پایدار تولید می‌کند. سرعت واکنش آن بسیار سریع است و برای هر آمینواسید فقط یک محصول می‌دهد. واکنش PITC با آمینواسیدها در شکل ۱ نشان داده شده است. به منظور مشتق‌سازی آمینواسیدها مقادیر ۲۰ و ۴۰ میکرولیتر از محلول استخراجی از خاک یا کود به تیوپ‌های شیشه‌ای منتقل شد و در ظرف خلاء محتویات آن کاملاً خشک شد. به هر یک از تیوپ‌های شیشه‌ای حاوی استاندارد و نمونهٔ خشک شده، ۲۰ تا ۳۰ میکرولیتر از محلول تنظیم pH اضافه و هم زده شد و در ظرف خلاء قرار داده تا کاملاً خشک شوند. محلول تنظیم pH حاوی نسبت ۱:۲:۲ به ترتیب از آب، اتانول و تری‌اتیل‌آمین است که بصورت تازه در هر بار آنالیز، در ظروف تیره و کاملاً تمیز و اختصاصی برای این کار تهیه و مخلوط شد. این مرحله تری‌اتیل‌آمین باعث بازی شدن محیط می‌شود و شرایط را جهت مشتق‌سازی مهیّا می‌کند. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول مشتق‌ساز اضافه و ورتکس شد. محلول مشتق‌ساز حاوی نسبت ۱:۱:۱:۷ به ترتیب از اتانول، آب، تری‌اتیل آمین و فنیل ایزوتیوسیانات است. پس از اضافه کردن محلول مشتق‌ساز، نمونه‌ها و استانداردها ۲۰ دقیقه در تاریکی و در دمای محیط قرار داده شد تا واکنش بین PITC و آمینواسیدها کامل گردد. سپس تیوپ‌ها در ظرف خلاء قرار داده شد (حذف حلال) تا کاملاً خشک شوند. این استانداردها و نمونه‌های خشک شده را می‌توان تا این مرحله در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد برای روزهای بعد نیز نگهداری کرد



شکل ۱- واکنش مشتق‌سازی آمینواسیدها با واکنشگر PITC

هنگام آنالیز با دستگاه HPLC به هر یک از تیوپ‌ها ۴۰۰ میکرولیتر محلول رقیق‌کننده اضافه و هم زده شد. برای تهیه محلول رقیق کننده، ۷۱ میلی‌گرم سدیم دی‌هیدروژن فسفات (Merck, Germany) با آب به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. pH محلول با اسید فسفریک ۱۰٪ روی ۴ تنظیم شد و ۹۵ میلی‌لیتر از این محلول با ۵ میلی‌لیتر استونیتریل با هم حل شدند.

۶-۲- آنالیز آمینواسید توسط روش فنیل ایزوتیوسیانات-کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

در این روش از روش گرادیانی برای جداسازی آمینواسیدها استفاده شد. برای آماده‌سازی فاز متحرک (حلال‌های A و B) بدین صورت عمل شد. حلال A: ۱۹ گرم سدیم استات تری‌هیدرات (Merck, Germany) در ۳/۴ حجم بالن ۱۰۰۰ میلی‌لیتری و ۶۰۰ میکرولیتر تری‌اتیل آمین با هم حل شدند. سپس با استیک‌اسید، pH آن روی ۶/۴ تنظیم و با آب به حجم رسانده شد و این محلول توسط فیلتر با اندازه منفذ ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد. سپس ۹۴۰ میلی‌لیتر از این محلول با ۶۰ میلی‌لیتر استونیتریل حل شد. حلال B: محلول ۶۰٪ استونیتریل تهیه شد (محلولی با نسبت ۴۰:۶۰ حجمی/حجمی به ترتیب استونیتریل و آب). برای جداسازی بهتر نمونه و ایجاد تعادل نمونه و فاز متحرک با فاز ساکن و در نتیجه زمان ماندگاری مناسب از برنامه گرادیانی مناسب و بهینه‌سازی شده، استفاده گردید. برنامه گرادیانی شستشو ابتدا ایزوکراتیک با ۱۰۰٪ حلال A برای مدت ۱ دقیقه، اولین مرحلهٔ گرادیان با ۵۴٪ حلال A و ۴۶٪ حلال B تا ۱۰ دقیقه، سپس با ۱۰۰٪ حلال B در ۰/۵ دقیقه، ایزوکراتیک با ۱۰۰ ٪ حلال B برای مدت ۱/۵ دقیقه، گرادیان از ۱۰۰ تا ۰ ٪ حلالB در ۰/۵ دقیقه و در انتها ایزوکراتیک با ۰ ٪حلال B و ۱۰۰ ٪ حلال A برای مدت ۷ دقیقه جهت شستشو.زمان اجرای کروماتوگرافی ۲۳ دقیقه بود که شامل ۱۲ دقیقه بین تزریق‌ها بود تا اجزای مشتقات کود-PITC شسته شوند.

۷-۲- آنالیز نمونه

در روش کروماتوگرافی مایع، جهت آنالیز نمونه، هنگام تزریق استانداردها و نمونه به دستگاه HPLC به هر یک از تیوپ‌ها ۴۰۰ میکرولیتر محلول رقیق‌کننده اضافه کرده و به هم زده شد. مشتق آمینواسیدها و فنیل ایزوتیوسیانات با استفاده از دستگاه HPLC در ستون C_{18} با روش فاز معکوس و بر اساس آب‌گریزی گروه جانبی آمینواسید و به کمک یک بافر آب‌گریز (استونیتریل)

از ستون جدا شده و در طول موج ۲۵۴ نانومتر آشکارسازی می‌شود. در این روش شرایط مشتق‌سازی باید به صورتی باشد که نمونه‌ها تا حد امکان خالص باشند.

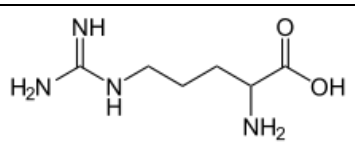
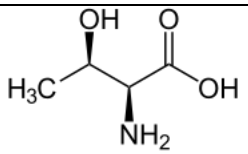
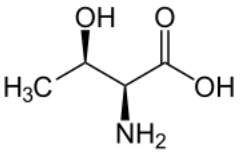
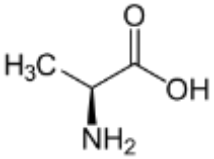
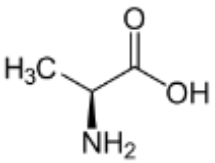
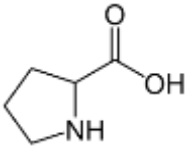
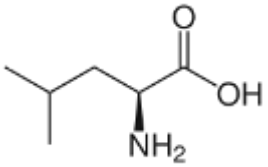
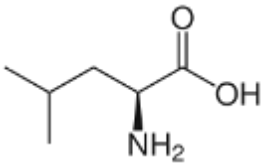
۳- بحث و نتیجه‌گیری

۳-۱- بهینه‌سازی شرایط جداسازی

از جمله پارامترهای مؤثر بر فرآیند جداسازی آمینواسیدها، pH فاز متحرک، مقدار غلظت TEA، دمای ستون می‌باشند. چندین پارامتر موثر روی جداسازی پیک‌های آمینواسیدها، از جمله pH فاز متحرک، غلظت بافر، غلظت تری اتیل آمین (TEA) و دمای ستون بهینه شدند. این عوامل به شدت بر جداسازی و ترتیب شستشو مشتقات اسید آمینه تأثیر می گذارند [۱۱].

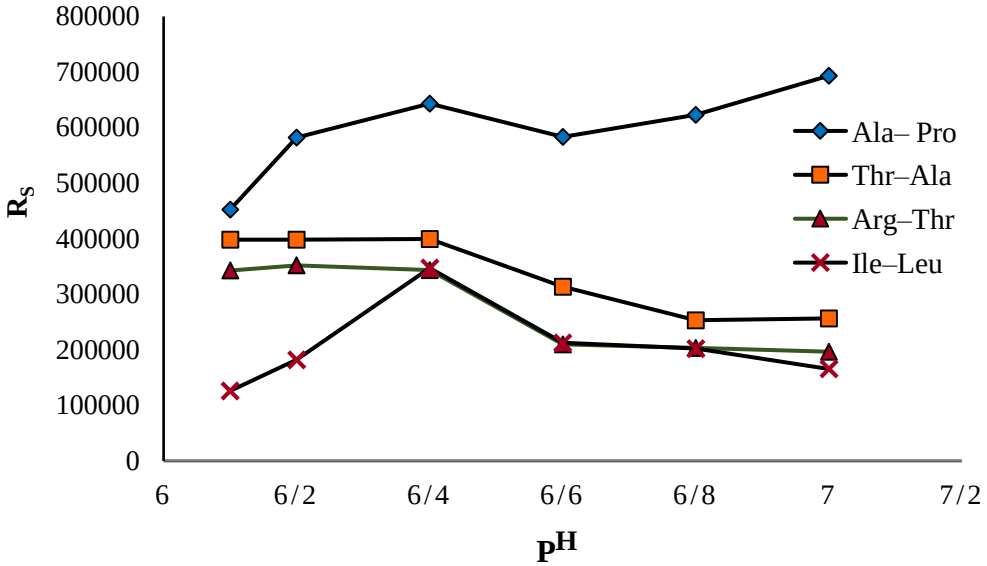
از آن‌جا که پیک‌های ۴ زوج از آمینواسیدها (Arg-Thr، Thr-Ala، Ala-Pro و Ile-Leu) به سختی جدا می‌شوند، برای بهینه سازی قدرت تفکیک این ۴ زوج پیک، به عنوان متغیر پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. ساختار این آمینواسیدها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- چهار زوج آمینواسید با پیک‌های HPLC نزدیک به هم

۱	 آرژنین	 ترونین
۲	 ترونین	 آلانین
۳	 آلانین	 پرولین
۴	 ایزو لوسین	 لوسین

۳-۲- تاثیر pH فاز متحرک روی جداسازی پیک‌ها

به دلیل وابستگی موقعیّت‌های مختلف چندین آمینواسید مهـم به میزان pH، فاز متحرّک نیاز به کنترل دقیق pH دارد. به این ترتیب میزان pH فاز متحرّک A مورد سنجش قرار گرفت. تاثیر pH فاز متحرک روی قدرت تفکیک پیک آمینواسیدها در محدوده ۷-۶/۱ مورد بررسی قرار گرفت. تغییر pH با استفاده از استیک‌اسید انجام شد. مطابق نتایج نشان داده شده در شکل ۲ تغییر pH تأثیر زیادی روی قدرت تفکیک پیک آمینواسیدهای Ile – Leu داشت. در pH بالاتر از ۶/۴ تفکیک پیک آمینواسیدهای Arg - Thr و Thr - Ala کاهش یافت. آمینواسیدهای مشتق شده دیگر از PITC تفکیک خوبی را نشان دادند. به همین دلیل برای فاز متحرّک A، pH= ۶/۴ برای جداسازی هر ۱۷ آمینواسید انتخاب شد (شکل ۲).



شکل ۲- تأثیر pH فاز متحرّک بر تفکیک چهار جفت از مشتقات-PTC

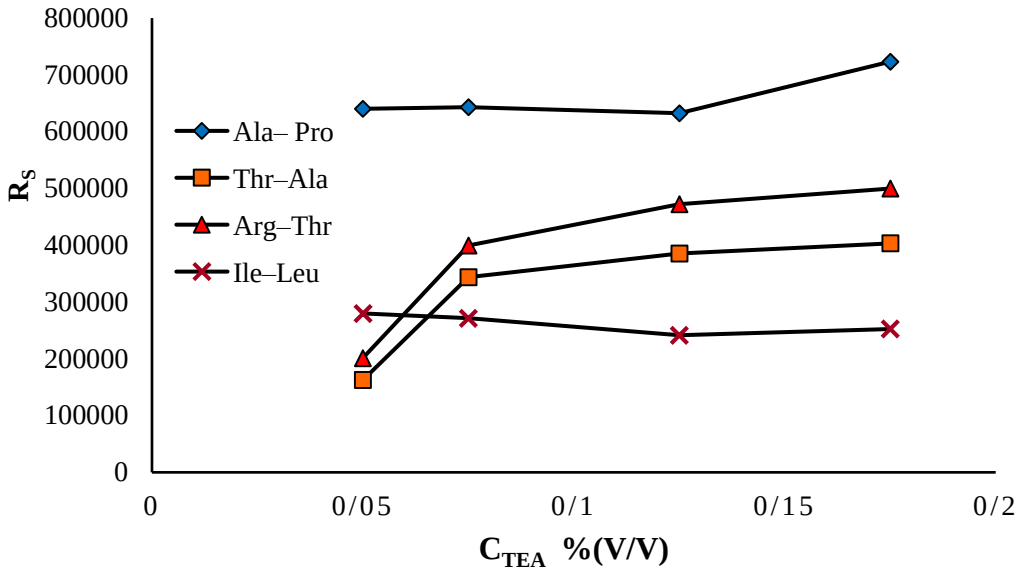
۳-۳- تاثیر غلظت بافر فاز متحرک روی جداسازی پیک‌ها

عامل موثر دیگر روی قدرت تفکیک پیک‌ها غلظت اسید استیک در فاز متحرک آبی بود. چندین محلول بافر اسید استیک/استات از M ۱/۲-۰/۰ تهیه و جداسازی پیک آمینواسیدها در این غلظت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج جداسازی در غلظت ۰/۱۴ بافر مطلوب بودند بنابراین این غلظت به عنوان غلظت بافر مطلوب انتخاب شد.

۳-۴- تاثیر غلظت TEA در فاز متحرک روی جداسازی پیک‌ها

اثر TEA توسط یک مکانیزم زوج یونی با مشتق آمینواسید، علاوه بر حفاظت از گروه‌های آزاد سیلانول در فاز ساکن، حضور آن در فاز متحرّک در تفکیک مشتقات Arg-Thr و Thr-Ala بسیار ارزشمند است [۱۲]. فاز متحرک آبی با غلظت‌های مختلف TEA تهیه و قدرت تفکیک پیک آمینواسیدها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آن در شکل ۳ نشان داده شده است. در محدوده غلظت‌های ٪ ۰/۱۷-۰/۰۵ TEA (v / v) ، قدرت تفکیک پیک‌های آمینواسیدها افزایش یافت به جـز Ile–Leu که تقریباً ثابت

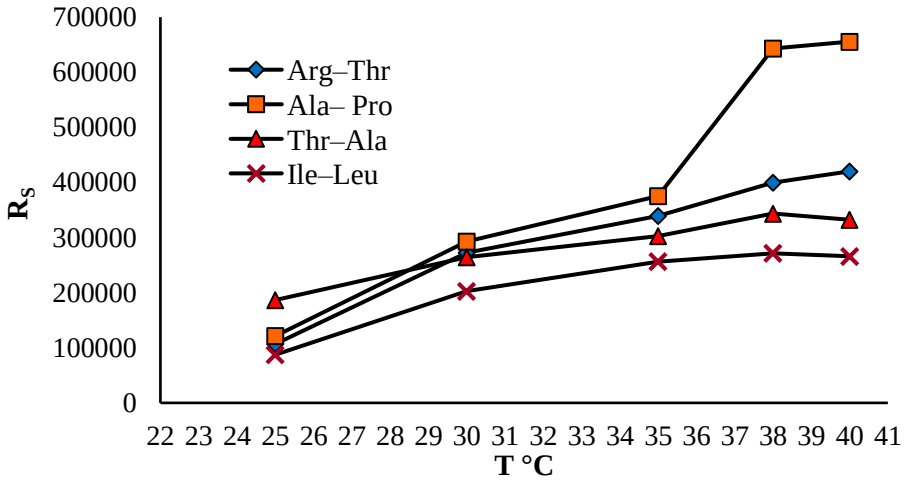
بود. شرایط بهتر در فاصله ٪ ۰/۱ – ۰/۰۶مشاهده شد. بنابراین غلظت ۰/۰۶٪ به عنوان شرایط کاری مناسب انتخاب شد. در غلظت‌های بالاتر TEA، تفکیک مشتقات Pro کاهش یافت.



شکل ۳- تأثیر غلظت TEA در فاز متحرّک بر تفکیک چهار جفت از پیک‌های مشتقات- PTC

۵-۳- بهینه سازی تاثیر دمای ستون کروماتوگرافی روی جداسازی پیک‌ها

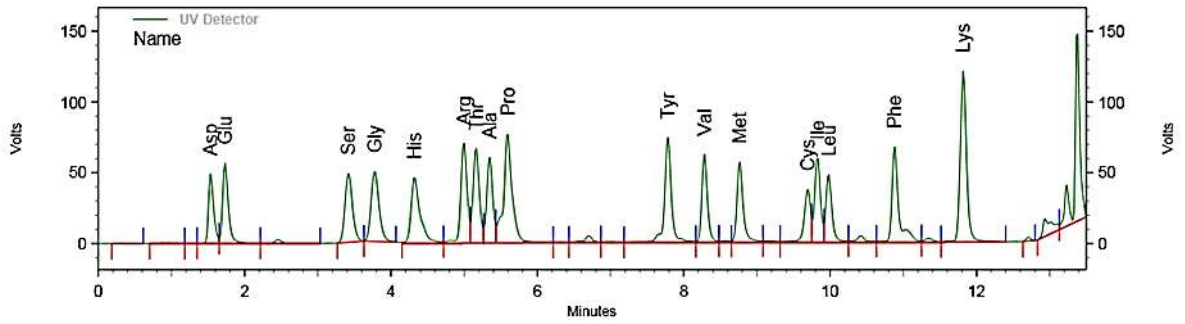
تأثیر دمای ستون روی جداسازی جفت پیک‌ها از دمای ۲۵ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. مطابق نتایج نشان داده شده در شکل ۴، وابستگی قدرت تفکیک Ala-Pro و Arg-Thr به دما فراتر از بازه دمایی مورد مطالعه است، در حالی که قدرت تفکیک Ile-Leu در دمای بالاتر از ۳۸ درجه سانتی‌گراد تقریباً ثابتی می‌ماند. بنابراین ۳۸ درجه سانتی گراد دمای کاری مناسب آون ستون انتخاب شد، چرا که بالاتر از این درجه حرارت، قدرت تفکیک Thr-Ala کاهش می‌یابد. در ضمن دمای کاری انتخاب شده اجازه می‌دهد که طول عمر ستون بیشتر شود.



شکل ۴- تأثیر دمای ستون بر تفکیک چهار جفت از پیک‌های مشتقات-PTC

۶-۳- بررسی روش

در شرایط بهینه کروماتوگرام استاندارد آمینواسیدها (هر پیک مربوط به ۰/۰۲۵ میکرو مول بر میلی‌لیتر از آمینواسید) در شکل ۵ آورده شده است. پس از بهینه‌سازی شرایط جداسازی، تحت شرایط بهینه منحنی‌های واسنجی هر یک از آمینواسیدها رسم شدند.



شکل ۵- کروماتوگرام استاندارد آمینواسیدها

ارقام شایستگی روش شامل تکرارپذیری، ضریب همبستگی، گستره خطی[1]، حد کمی (LOQ)[2] و حد تشخیص (LOD) روش محاسبه شدند.

حد تشخیص یک روش را می‌توان از دو راه نظری و تجربی تعیین کرد. برای محاسبه حدتشخیص از راه نظری، انحراف استاندارد نشانک[3] شاهد (S_b) بر شیب منحنی واسنجی (m) تقسیم و با سه برابرکردن نتیجه، LOD به دست می‌آید (معادله ۱).

$$LOD = \frac{3Sb}{m} \quad (۱)$$

در روش تجربی، غلظتی از گونه که ایجاد پیک قابل رؤیتی به اندازه ۳ تا ۴ برابر نوفه[4] می‌کند، به عنوان LOD انتخاب می‌شود. در کار حاضر، حدتشخیص آمینواسیدها از روش نظری به دست آمد.

برای محاسبه حد کمی مقدار حد تشخیص را در ۳/۳ ضرب می‌کنیم.

$$LOQ = 3.3 \times LOD \quad (۲)$$

تکرارپذیری روش که معیاری از دقت روش است، با عاملی به نام درصد انحراف استاندارد نسبی RSD[5] بیان می‌شود. برای محاسبه RSDدر یک روز کاری، ۳ بار استخراج و آنالیز تحت شرایط بهینه از یک غلظت از آنالیت انجام شد. سپس، انحراف استاندارد

[1]Linear Dynamic Range (LDR)
[2]Limit of Quantitation (LOQ)
[3] Signal
[4] Noise
[5] Relative standard deviation

سطح زیر پیک (S_d) به دست آمده در فرمول زیر قرار داده و مقدار % RSD در یک روز کاری محاسبه شد. $\bar{x}$ میانگین انتگرال سطح زیر پیک است.

$$RSD\% = (Sd / \bar{x}) \times 100$$

بر پایه نتایج به دست آمده از نمودارهای واسنجی آمینواسیدها، ارقام شایستگی روش برای هر یک از آمینواسیدها در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- ارقام شایستگی تعیین آمینواسیدها

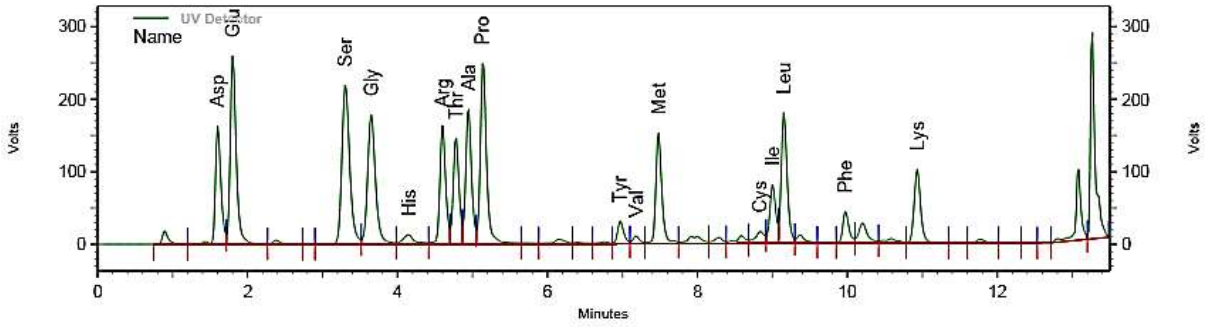
آمینواسید	دامنه خطی LDR (µmol/mL)	(R^2)	حد تشخیص LOD (µmol/mL)	حد کمی LOQ (µmol/mL)	تکرارپذیری RSD (%)
گلوتامیک اسید	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۰/۹۵۸	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۳/۶
آسپارتیک اسید	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۱/۰۰۰	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۳/۹
سرین	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۰/۹۹۹	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۴/۲
گلایسین	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۰/۹۹۹	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۴/۳
هیستیدین	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۰/۹۹۹	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۵/۱
آرژنین	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۰/۹۹۶	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۳/۸
تروئونین	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۱/۰۰۰	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۴/۲
آلانین	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۱/۰۰۰	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۴/۴
پرولین	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۰/۹۹۵	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۵/۹
تیروزین	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۰/۹۹۹	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۴/۳
والین	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۰/۹۹۹	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۵/۱
متیونین	/۰۱۵۶– ۰/۰۶۲۵	۱/۰۰۰	۰/۰۰۴۷	۰/۰۱۵۶	۵/۵
سیستئین	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۰/۹۸۶	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۶/۱
ایزولوسین	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۰/۹۹۲	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۳/۲
لوسین	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۱/۰۰۰	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۳/۵
فنیل آلانین	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۰/۹۹۹	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۴/۸
لایسین	۰/۰۳۱۲ – ۰/۱۲۵	۰/۹۹۹	۰/۰۰۹۴	۰/۰۳۱۲	۵/۱

۳-۷- تجزیه نمونه‌های حقیقی

به منظور بررسی عملکرد روش مورد نظر برای سنجش آمینواسیدهای آزاد در نمونه‌های حقیقی، کارایی آن در برخی نمونه‌های خاک و کود کشاورزی بررسی شد. به منظور بررسی عملکرد روش ارائه شده در اندازه‌گیری آمینواسیدها در نمونه‌های کود و خاک، تکرار پذیری و درصد بازیابی روش اندازه‌گیری شد.

به منظور محاسبه درصد بازیابی، ابتدا دو نمونه کود از برند معتبر با درصد مشخص آمینو اسید خریداری شده و با روش مورد نظر در شرایط بهینه مشتق‌سازی و آنالیز شدند. سپس مقدار درصد بازیابی روش محاسبه گردید. مقادیر درصد بازیابی آمینواسیدهای آزاد در نمونه‌های کود در بازه ٪۹۹-٪۹۶ درصد به دست آمد. در ادامه به منظور محاسبه درصد بازیابی در نمونه خاک، ابتدا دو نمونه خاک در شرایط بهینه مشتق‌سازی و آنالیز شدند. در ادامه، به همان نمونه‌ها مقدار مشخصی از استاندارد آمینواسیدها (۰/۱ µmol/mL) اضافه گردید و مجدداً مشتق‌سازی و آنالیز انجام شد. مقادیر درصد بازیابی آمینواسیدهای آزاد در

نمونه‌های خاک در بازه ٪۹۷-٪۹۴ درصد به دست آمد. تکرار پذیری روش برای نمونه کود (٪۵/۶ > RSD) و نمونه خاک (٪۷/۵ > RSD) قابل قبول بود. کروماتوگرام یک نمونه کود آنالیز شده در شکل ۶ آورده شده است.



شکل ۶ – کروماتوگرام نمونه کود

۴- نتیجه گیری

روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، روشی کارآمد برای سنجش غلظت آمینواسیدهای آزاد در نمونه‌های مختلف خاک و کود است. به منظور مشتق‌سازی آمینواسیدها، واکنشگر فنیل ایزوتیوسیانات (PITC) موفق بود. مشتقات فنیل تیوکاربامیل-آمینواسید در ستون فاز معکوس با استفاده از شویش گرادیانی با بافر سدیم استات تری‌هیدرات و استونیتریل-آب (۴۰:۶۰ [حجمی/حجمی]) جداسازی، و توسط آشکارساز UV در طول موج ۲۵۴ نانومتر آشکارسازی شدند. pH و دمای فاز متحرک، غلظت بافر و اصلاح کننده (تری اتیل آمین) در فاز متحرک، پارامترهای موثر بر جداساری آمینواسیدها بودند که بهینه شدند. در نهایت با این روش، درصد آمینواسیدهای آزاد در نمونه‌های مختلف خاک و کود اندازه‌گیری شد.

۵- تقدیر و تشکر

از ریاست محترم موسسه تحقیقات خاک و آب و ریاست محترم دفتر ثبت و کنترل کیفی مواد کودی به دلیل حمایت مالی و سایر حمایت‌هایشان از پروژه، تشکر می‌گردد.

۶- منابع

[1] M. K. Souri, *Open Agriculture*, **1** (2016) 118.

[2] S. A. Faten, A. M. Shaheen, A. A. Ahmed and A. R. Mahmoud. *Research Journal of Agriculture and Biological Science*. **6** (2010): 583.

[3] M. I. Tyler, *Methods in Molecular Biology*, **159** (2000) 1.

[4] T. Qiu, H. Li and Y. Cao, *Afr. J. Biotechnol*, **9** (2010) 8679.

[5] H. Kataoka, S. Matsumura, S. Yamamoto and M. Makita, *Methods in Molecular Biology*, **159** (2000) 101.

[6] M. Santiago and S. Strobel, *Methods in Enzymology*, **533** (2013) 303.

[7] S. W. Suna, Y.C. Lina, Y. M. Wenga and M.J. Chen. *J. Food Composit. Anal.*, **19** (2006) 112.

[8] A. Ghaffarinead, M. Ghaedrahmati, R. Salahandish, *J. of Applied Chemistry*, **51**(1398) 103, in Persian.

[9] M. J. G. Castro, J. L. Hernández, J. S. Lozano and M. J. O. Concha. *J. Chromatogr. Scien*, **35** (1997) 181.

[10] D. L. Jones, A. G. Owen and J. F Farrar, *Soil Biology & Biochemistry,* **34** (2002) 1893.

[11] H. S. Lu, P. H. Lai, *J. Chromatogr. A*, **368** (1986) 215.

[12] R. Somack, *Anal. Biochem*. **104** (1980) 464.