

UYGULAMA NOTU

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi

L001

HPLC ile Gübre Numunelerinde Serbest Aminoasitlerin Tayini

HAZIRLAYAN

Yük. Kimyager Ozan HALIŞÇELİK
Ant Teknik Cihazlar Ltd. Şti.

KONU:

Gübre Numunelerinde Serbest Amino Asitlerin Tayini

ÇALIŞMANIN AMACI:

Gübrenin verimliliğini arttırmak için kullanılan amino asitlerin sıvı ve katı formdaki gübrelere kantitatif tayini.

Gübre numunelerinde kompleks iyonize matrikse sahip olduğu bilinen amino asitler tüm yan zincirleri bir arada düşünüldüğünde, artı veya eksi yüklülükten hidrofobiğe kadar oldukça fazla çeşitli yapısal özellikler gösterirler. Ayrıca bu yan zincirler, oldukça farklı çeşitlilikte kovalent ve non-kovalent bağların yapısına katılabilirler. Gübredeki analizlerinde 1.amino asitler OPA ve 3-MPA türevlendiricileri vasıtasıyla SPD-20A dedektör ile 338 nm UV bölgede ya da RF-20A dedektör ile 340 nm Ex – 450 nm Em'da tayin edilebilirken, 2.amino asitler FMOC türevlendiricisi kullanılarak SPD-20A dedektör ile 262 nm UV bölgede ya da RF-20A dedektör ile 266 nm Ex – 305 nm Em'da tayin edilebilmektedir; burada elde edilen piklerin yüksekliği ve ölçülebilirliğini arttırmak amacı ile RF-20A dedektör; pikler arasındaki rezolüsyonu arttırmak amacı ile küçük yüzey çaplı ODS kolon ve Gerçekleşen reaksiyonların hassasiyeti için Nexera SIL-30AC oto örnekleyici kullanılabilir. Bu çalışmada RF-20A dedektör kullanılarak nitel ve nicel sonuca ulaşılabacaktır.

OPA : O-phtal aldehyde, 3-MPA : 3-mercaptopropanoic acid , FMOC : 9-fluorenylmethyl chloroformate

METOD ve MATERYALLER:

Numune ekstraksiyon için Sıvı-Sıvı Faz Ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Çalışma Shimadzu marka HPLC XR ve türevlendirme yapabilmek amacıyla Nexera SIL-30AC cihazıyla yapılmıştır.

KULLANILAN GÜBRE TÜRLERİ :

- ✓ Katı Gübre
- ✓ Sıvı Gübre

NUMUNE HAZIRLIK :

	ÇÖZELTİNİN ADI	HACMİ	İÇERİĞİ
1	Ekstraksiyon Çözeltisi	1L	8.2mL Derişik HCl ve 20 mL tiodiglikol karışımı * (0.1MHCl ve %2 tiodiglikol)
2	5-Sülfosalisilik Asit Çözeltisi	1L	60g 5-SSA (%6)
3	Sodyum Hidroksit Çözeltisi	1L	40g NaOH (1M)

*Çözelti hazırlanırken çeker ocak kullanılmalı ve tiodiglikol derişik asit ile direkt olarak karıştırılmamalıdır.

1	4 g numune tartılır.
2	100mL ekstraksiyon çözeltisi eklenir
3	Karışım, 60 dakika karıştırılır (Sıvı Numune için 10 dakika yeterlidir)
4	Karışım, berrak bir süpernatant oluşana kadar bekletilir.
5	4. adımda tanımlanan süpernatant çözeltisinden 10 mL alınır ve 5mL 5-SSA çözeltisi ile karıştırılır (5 dakika) ve ardından santrifüjlenir.
6	Elde edilen süpernatantın 10mL'sinin pH'ı 7,0'a ayarlanır ve su ile hacim, 100mL'ye tamamlanır ve türevlendirme işlemine geçilir.

MOBİL FAZ

Çözelti Adı	İçeriği	Konsantrasyonu
Mobil Faz A	Na ₂ HPO ₄	40 mM (Buffer) pH=7,8 (Katı NaOH ile ayarlanır)
Mobil Faz B	Asetonitril : Su : Metanol	45 45 : 10

TÜREVLENDİRME

Çözelti Adı	İçeriği	Konsantrasyonu	Türevlendirme Prosedürü
Borat Tamponu (Diluent)	Borik Asit + KOH	0,4 M (100 mL) 2,472g Borik Asit pH=9.8 (Katı KOH ile ayarlanır)	Diluent+Numune+OPA+FMOC+Su 5 : 1 : 1 : 1 : 64
Türevlendirici Karışımı	OPA + Diluent	10 mg OPA in 100 µL MeOH + 900uL Diluent + 10 uL 3-MPA	

HESAPLAMA : Numune değerlendirmesi iç ya da harici standart kalibrasyon yönteminden yararlanılarak kalitatif olarak yapılmıştır.

ANALİTİK KOŞULLAR:

Kolon : YMC Triart C18

Dedektör : RF-20 A

Gradient Koşulları :

Süre (dk)	Mobil Faz A	Mobil Faz B	RF-20A
0			340 nm Ex / 450 nm Em
0 - 2	100	0	
2.0 - 18.0	45	55	
16			266 nm Ex / 305 nm Em
18.0 - 18.5	0	100	
18.5 - 22.5	0	100	
22.5 - 24.0	100	0	
24.0 - 27.0	100	0	

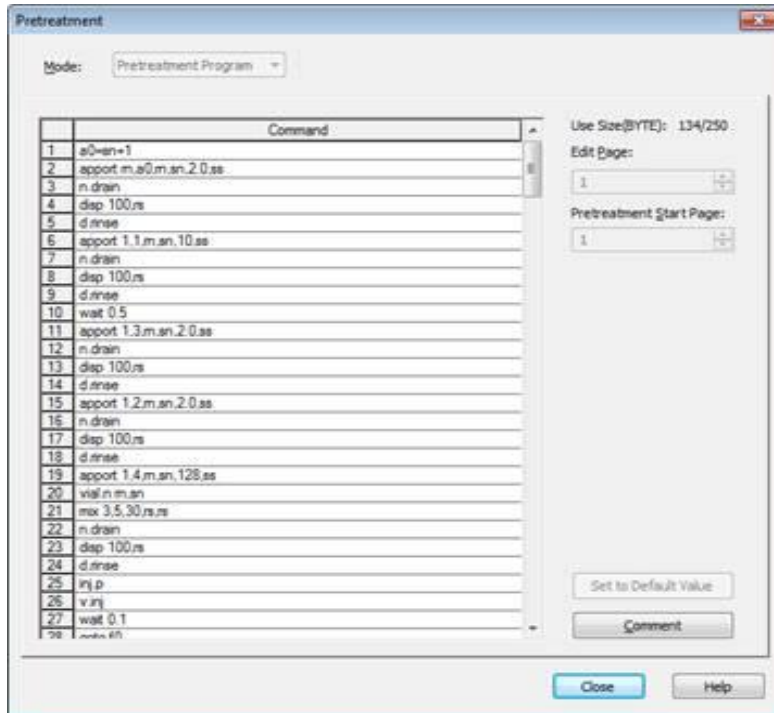
Akış Hızı Oranı : 2 mL/dk

Basınç Değeri : 230 bar ile 310 bar arasında değişebilir.

Kolon Sıcaklığı : 30C

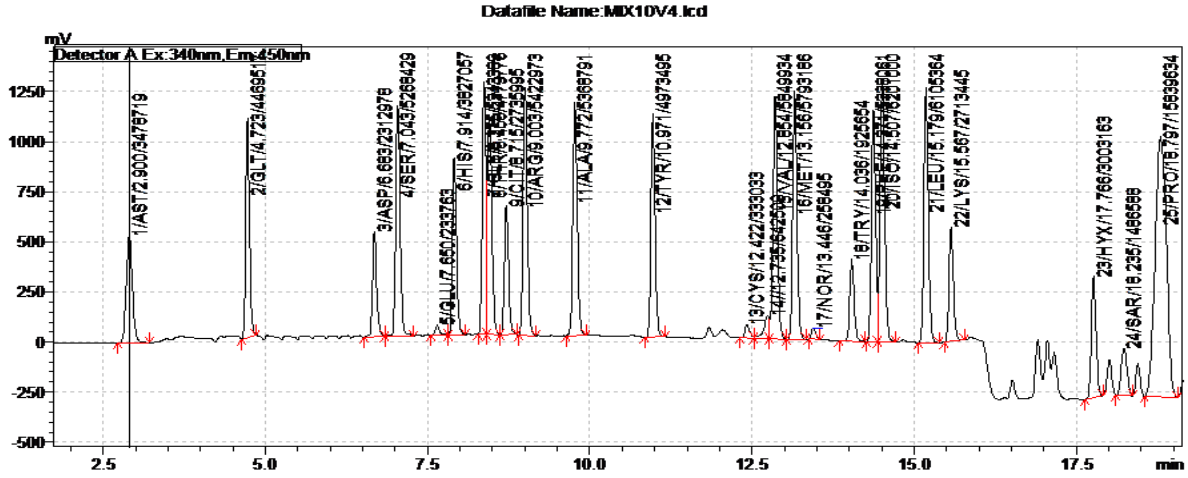
Oto Örnekleyici Sıcaklığı : 4C

Oto Örnekleyici Programı (Nexera SIL-30AC)

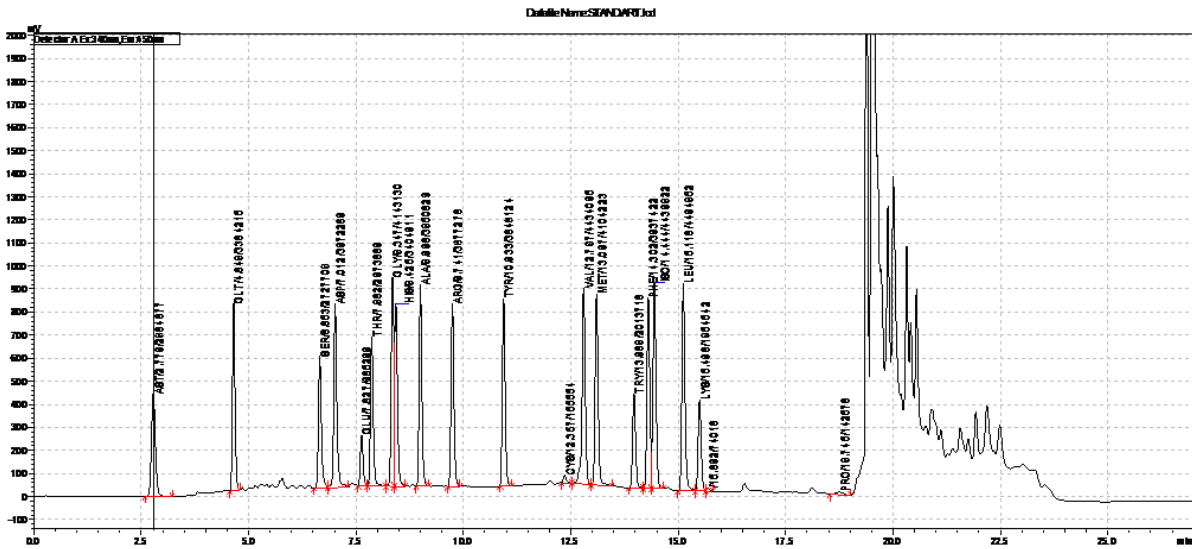


SONUÇLAR ve GÖRÜŞLER

1. Standart



Grafik 1.1: İç standartlarında dahil olduğu 24 katı amino asit standardından 2,5 ppm olacak şekilde hazırlanmış standart karışımının LC kromatogramı ; 16. dakikaya kadar Ex :340 nm, Em:450 nm, 16.dakikadan sonra, Ex : 266 nm, Em:305 nm'dir.



Grafik 1.2: 20 katı amino asit standardından 1 ppm olacak şekilde hazırlanmış standart karışımının LC kromatogramı.

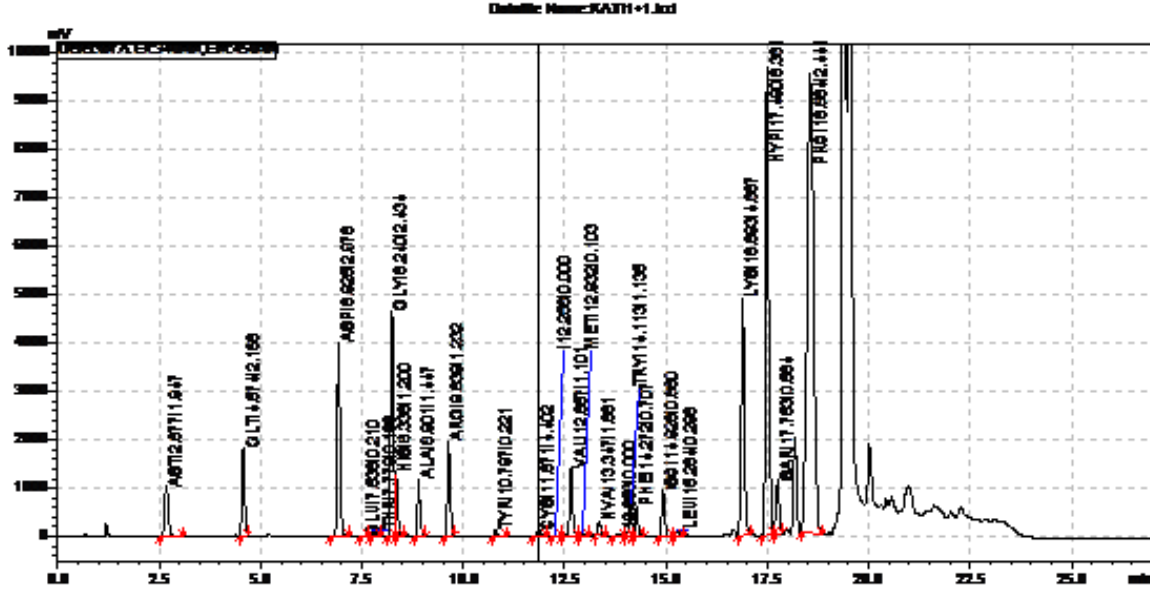
Tablo1.1: Amino Asitlerin Kodları ve Molekül Ağırlıkları

AMINO ASIT	MOLEKÜL AĞIRLIĞI	KOD	AMINO ASIT	MOLEKÜL AĞIRLIĞI	KOD
ASPARTATE	133.1	AST	CYSTINE	240.3	CYS
GLUTAMATE	147.1	GLT	VALINE	117.2	VAL
ASPARGINE	132.1	ASP	METHIONINE	149.2	MET
SERIN	105.1	SER	NORVALINE (IS)	117.2	NOR
GLUTAMINE	146.1	GLU	TYRPTOPHAN	204.2	TRP
HISTIDINE	155.2	HIS	P.ALANIN	165.2	PHE
GLYCINE	75.07	GLY	ISOLEUCINE	131.2	ISO
THREONIN	119.1	THR	LEUCINE	131.2	LEU

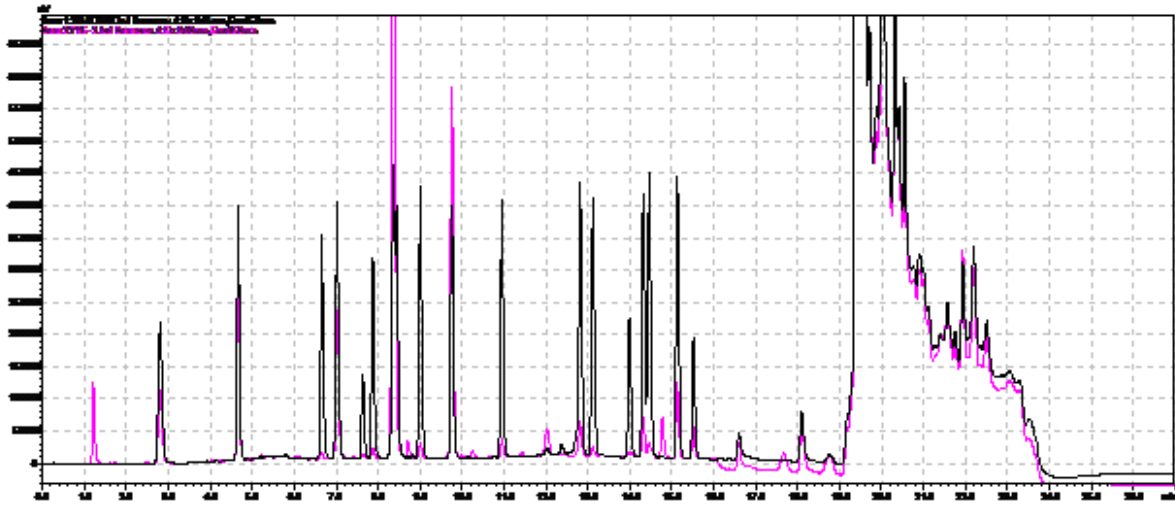
CITRULLINE	175.2	CIT
ARGININE	174.2	ARG
ALANINE	89.09	ALA
TYROSINE	181.2	TYR

LYSINE	146.2	LYS
HYDROXYP	131.1	HYX
SARCOSINE (IS)	89.1	SAR
PROLINE	115.1	PRO

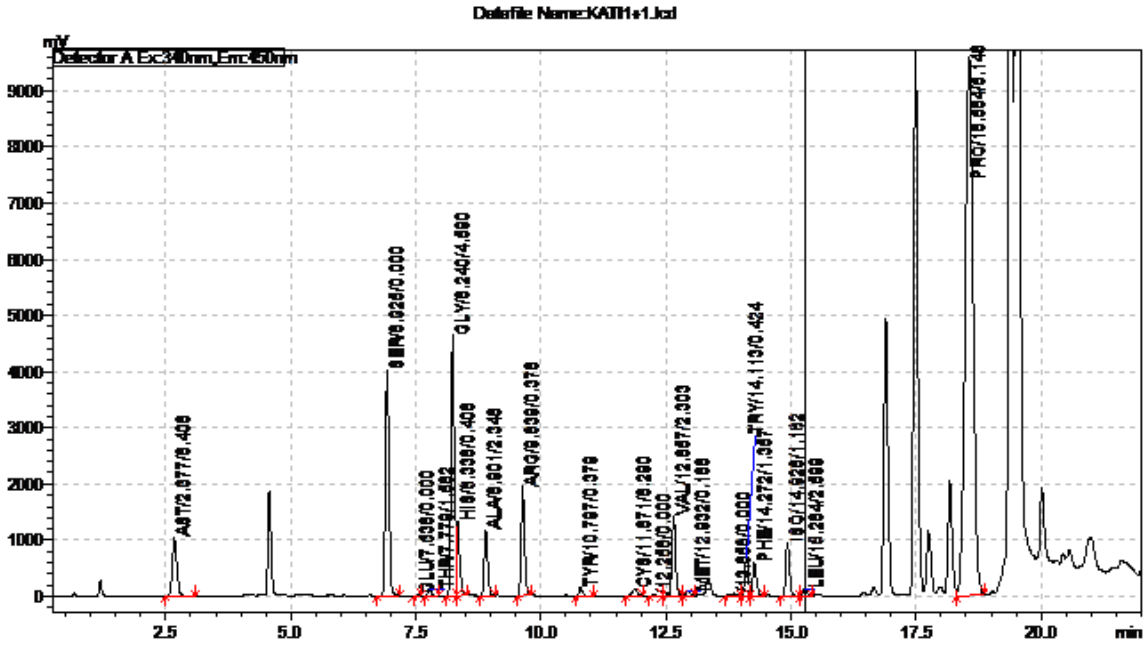
2. Katı Numune:



Grafik 2.1: Katı numune ön hazırlık işlemi bitirildikten sonra 0,45µ Nylon filtreden süzülerek sisteme enjekte edilmiştir.

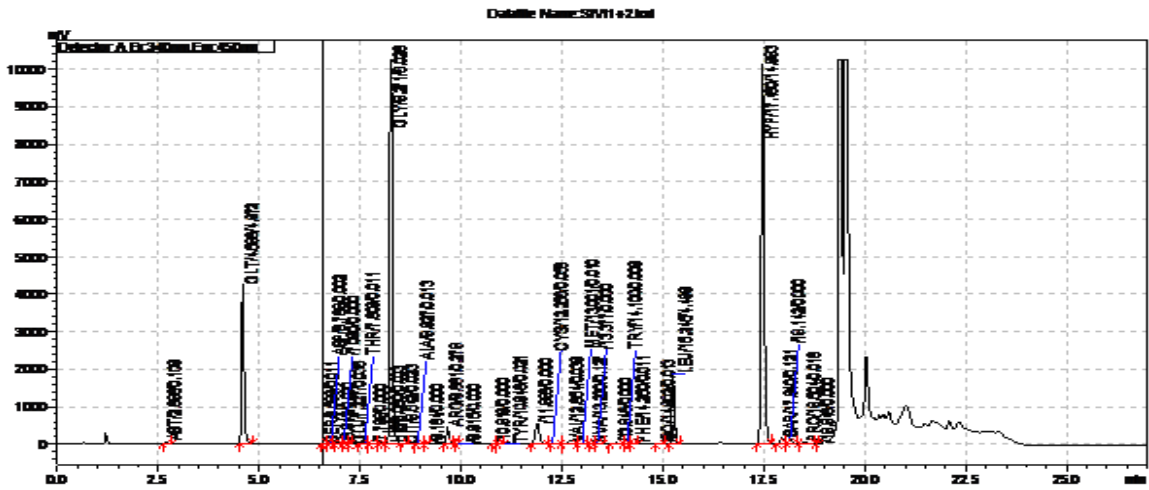


Grafik 2.2: Standart ve katı numune arasındaki LC kromatogramlarının karşılaştırılması (siyah: standart, pembe: katı numune)



Grafik 2.3: Katı numune için yapılan geri kazanım çalışmasının LC kromatogramı.

3.Sıvı Numune:



Grafik 3.1: Sıvı numune ön hazırlık işlemi bitirildikten sonra 0,45µ Nylon filtreden süzülerek sisteme enjekte edilmiştir.

Bu Aplikasyon Notu uygulamanın gerçekleştirildiği tarihe ait bilgiler ışığında oluşturulmuştur.
 Bu yayında yer alan bilgilerin referans gösterilerek başka bir yerde kullanılması Ant Teknik'in iznine tabidir.
 Aplikasyon Notu Ant Teknik tarafından önceden bildirilmeksizin değiştirilebilir.