

HPLC İLE PREMİKS, GÜBRE VE YEMDE AMİNO ASİT UYGULAMASI



Yüksek Kimyager Ozan HALIŞÇELİK
ANT TEKNİK CİHAZLAR -
Servis Müdür Yardımcısı

KONU:

Zirai katkı maddelerinde hammadde olarak eklenmiş serbest amino asitlerin HPLC ile analizi.

ÇALIŞMANIN AMACI:

Ülkemizde çok az laboratuvarında gerçekleşen serbest amino asitlerin uygulamaları, bu çalışmada genelde tercih edilen floresans dedektörlü bir HPLC sistemi yerine UV dedektörlü bir HPLC sisteminde denenmiş ve kesin ve güvenilir sonuçlara ulaşılmıştır.

METOD VE MATERYALLER:

Çalışma yeni nesil kompakt HPLC sistemleri olan LC2030C Plus cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

ANALİTİK KOŞULLAR:

LC Koşulları;



Cihaz
Model
Kolon
Mobil Faz A

: Shimadzu HPLC
: LC2030C PLUS
: Shim-pack ODS 150*4,0mm
: 20 mM Potasyum Fosfat Tamponu pH 6,9 : 800 mL

Mobil Faz B
Akış Oranı
Kolon Fırın Sıcaklığı
Dedektör
Enjektör Hacmi
Analiz Süresi
Oto Örnekleyici Sıcaklığı

suya 1,73 g K₂HPO₄ ve 1,37 g KH₂PO₄ eklenir ve çözülerek 1000 mL hacme su ile tamamlanır
: ACN - MeOH - Su [45 - 40 - 15]
: 1.0 mL/dk (Gradient program)
: 40 °C
: 338nm ve 262nm
: 11 uL
: 29 dk
: 4 °C

GRADİENT PROGRAMI:

	Time	Module	Command	Value
1	5,64	Pumps	Solvent B Conc.	13
2	9,40	Pumps	Solvent B Conc.	31
3	14,11	Pumps	Solvent B Conc.	37
4	18,81	Pumps	Solvent B Conc.	70
5	19,75	Pumps	Solvent B Conc.	100
6	25,39	Pumps	Solvent B Conc.	100
7	26,33	Pumps	Solvent B Conc.	11
8	29,00	Controller	Stop	

TÜREVLENDİRİCİ HAZIRLIK:

3 -MPA; 10 uL 3-MPA sıvısı çeker
ocakta 10 mL pH=9,2 0,1N Borat
Tamponunda çözülür

OPA; 10 mg OPA 5 mL pH=9,2 0,1N
Borat Tamponunda çözülür

FMOC; 4 mg FMOC 20 mL ACN'de
çözülür

*0,1 N Borat Tamponu; 0,618 g Borik
Asit 80 mL suda çözülüp derişik NaOH
çözeltisi ile pH'sı 9,2'ye ayarlanıp 100 mL
hacme tamamlanır

NUMUNE ÇALIŞMASI:

1 g veya 1 mL gübre / premiks
numunesi 100 mL 0,1 N HCl'de direkt
olarak çözülür

*0,1 N HCl ana çözgen

BİLEŞENLER:

- » Aspartic acid
- » Glutamic acid
- » Serine
- » Glutamine
- » Histidine
- » Glycine
- » Threonine
- » Citrulline
- » Arginine
- » Alanine
- » Tyrosine
- » Cystine
- » Valine
- » Methionine
- » Tryptophan
- » Phenylalanine
- » Isoleucine
- » Leucine
- » Lysine
- » Hydroxy proline
- » Proline

*Bu belirtilen bileşenler 0,1 N HCl
ile çözülmüş, kalibrasyon Dış Standart
Yöntemi ile çizilmiştir, konsantrasyon
birimi g/100g'dır

TÜREVLENDİRME PROGRAMI:

Pretreatment

Mode: Reagent

Source Settings

Auto setting	Tray Number	Vial Number	Offset	Volume(uL)
			1	15

Reagent Settings

Reagent Use	Tray Number	Vial Number	Volume(uL)
<input checked="" type="checkbox"/> Reagent 1:	1	1	90
<input checked="" type="checkbox"/> Reagent 2:	1	2	44
<input checked="" type="checkbox"/> Reagent 3:	1	3	20

Mixing Setting

Mixing Count: 3

Mixing Volume: 5 uL

Mixing Upper Air: Use Not Use

Wait Time: 2,0 min

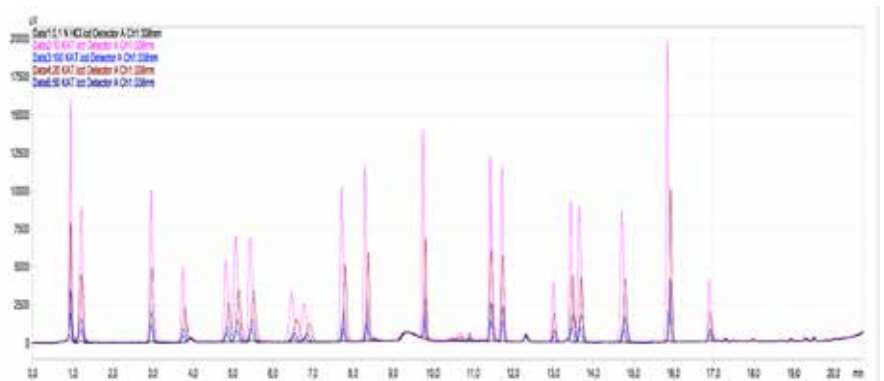
Comment:

OK Cancel Help

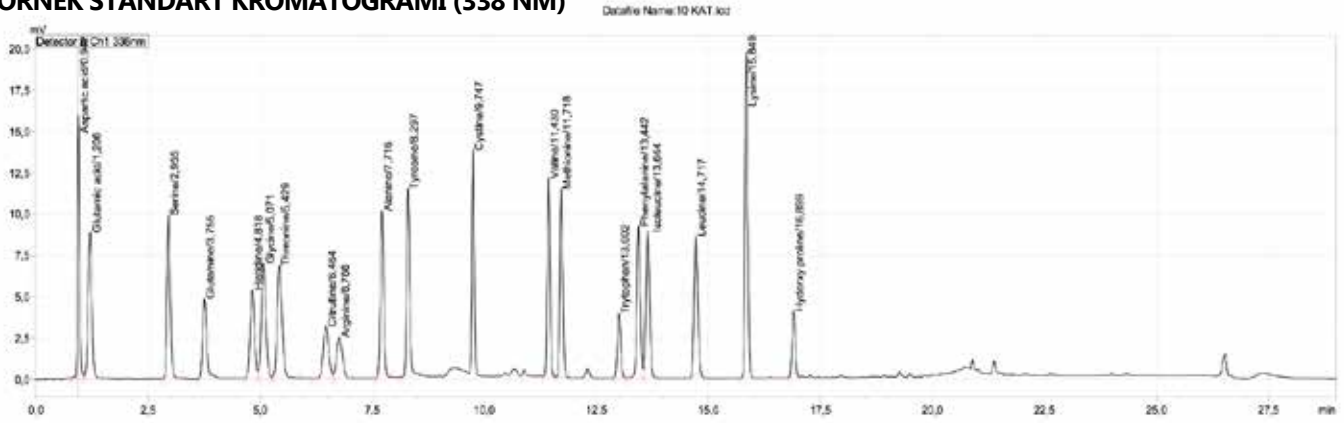
SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME:

Kromatogramlar

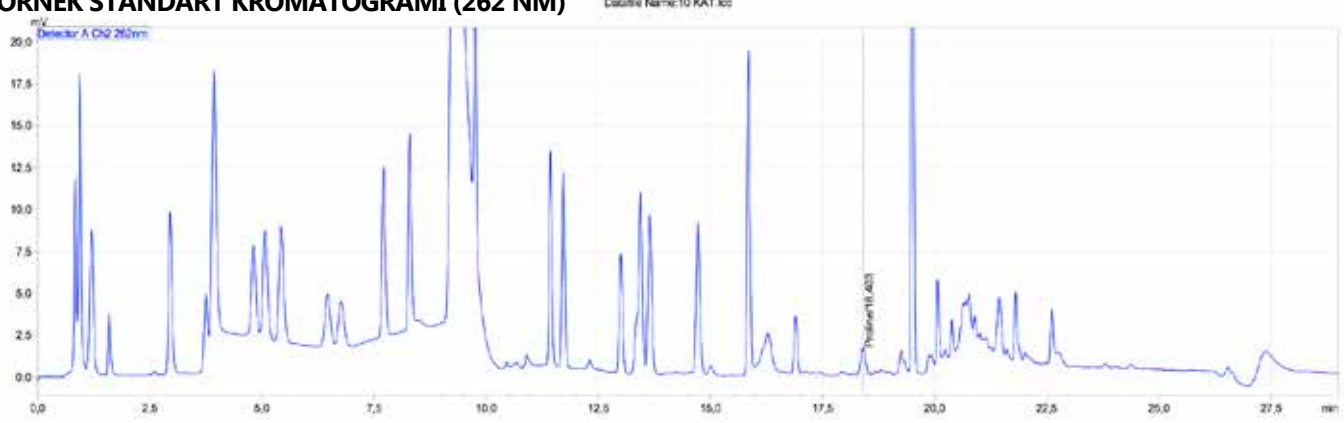
Farklı derişimdeki standart mix çözeltisi kromatogramları (338 nm'de)



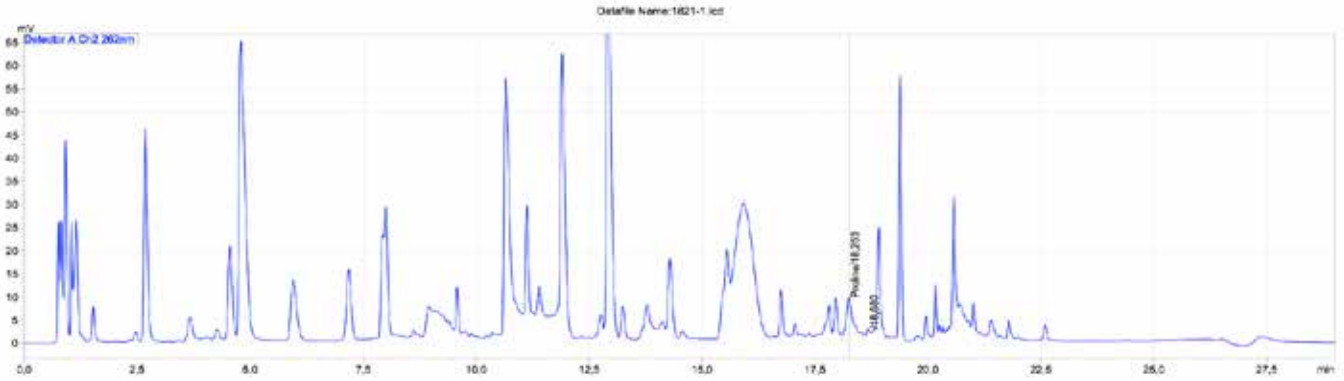
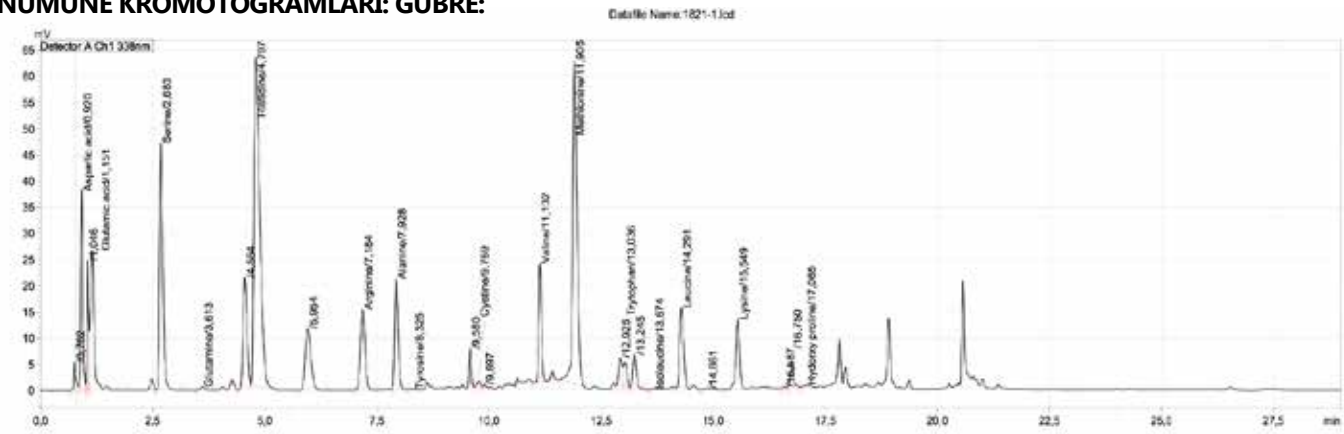
ÖRNEK STANDART KROMATOGRAMI (338 NM)



ÖRNEK STANDART KROMATOGRAMI (262 NM)

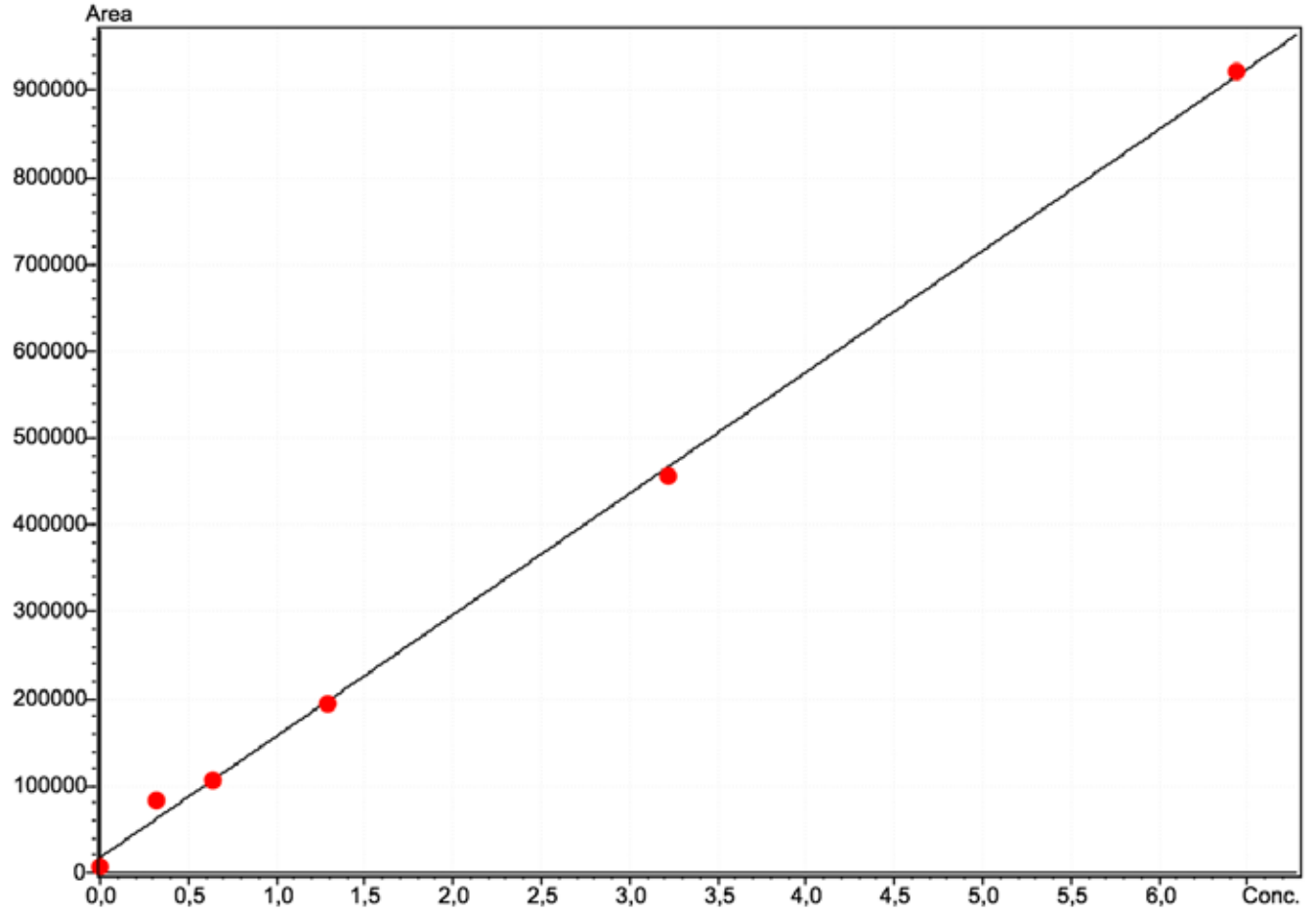


NUMUNE KROMOTOGRAMLARI: GÜBRE:



Group#	Group Name	Conc.	Unit
1	Toplam Amino Asit	14,952	g/100g

KALİBRASYON EĞRİSİ:



$Y = aX + b$
 $a = 139616$
 $b = 17625,3$
 $R^2 = 0,9988364$
 $R = 0,9994180$
 $RSS = 6,899006e+008$

Group#	Name	Conc.(1)	Conc.(2)	Conc.(3)	Conc.(4)	Conc.(5)	Conc.(6)	Unit	Type
1	Toplam Amino Asit	0	0,3221	0,6442	1,2884	3,221	6,442	g/100g	Target

ID#	Name	Type	Channel	Ret. Time	Conc.(1)	Conc.(2)	Conc.(3)	Conc.(4)	Conc.(5)	Conc.(6)	Group#
1	Aspartic acid	Target	Detector A - C	0,944	0	0,01965	0,0393	0,0786	0,1572	0,3144	1
2	Glutamic acid	Target	Detector A - C	1,212	0	0,0184	0,0368	0,0736	0,1472	0,2944	1
3	Serine	Target	Detector A - C	2,981	0	0,01315	0,0263	0,0526	0,1052	0,2104	1
4	Glutamine	Target	Detector A - C	3,800	0	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	1
5	Histidine	Target	Detector A - C	4,895	0	0,0194	0,0388	0,0776	0,1552	0,3104	1
6	Glycine	Target	Detector A - C	5,146	0	0,0094	0,0188	0,0376	0,0752	0,1504	1
7	Threonine	Target	Detector A - C	5,515	0	0,0149	0,0298	0,0596	0,1192	0,2384	1
8	Citrulline	Target	Detector A - C	6,591	0	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	1
9	Arginine	Target	Detector A - C	6,905	0	0,02175	0,0435	0,087	0,174	0,348	1
10	Alanine	Target	Detector A - C	7,808	0	0,01115	0,0223	0,0446	0,0892	0,1784	1
11	Tyrosine	Target	Detector A - C	8,375	0	0,02265	0,0453	0,0906	0,1812	0,3624	1
12	Cystine	Target	Detector A - C	9,810	0	0,015	0,03	0,06	0,12	0,24	1
13	Valine	Target	Detector A - C	11,496	0	0,0147	0,0294	0,0588	0,1176	0,2352	1
14	Methionine	Target	Detector A - C	11,740	0	0,01865	0,0373	0,0746	0,1492	0,2984	1
15	Tryptophan	Target	Detector A - C	13,028	0	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	1
16	Phenylalanine	Target	Detector A - C	13,485	0	0,02065	0,0413	0,0826	0,1652	0,3304	1
17	Isoleucine	Target	Detector A - C	13,692	0	0,01645	0,0329	0,0658	0,1316	0,2632	1
18	Leucine	Target	Detector A - C	14,800	0	0,01655	0,0331	0,0662	0,1324	0,2648	1
19	Lysine	Target	Detector A - C	15,934	0	0,01825	0,0365	0,073	0,146	0,292	1
20	Hydroxy proline	Target	Detector A - C	16,931	0	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	1
21	Proline	Target	Detector A - C	18,429	0	0,0144	0,0288	0,0576	0,1152	0,2304	1