J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 31, pp. 47-50, 2004
Archive of SID
مجله علوم و فنون هسته‌ای
شماره ۳۱، صفحات ۵۰-۴۷، ۱۳۸۳

Sci. and Tech. note
یادداشت علمی و فنی

بهینه‌سازی شرایط استخراج کُلاژن از نمونه‌های استخوانی در روش سالیابی با رادیوکربن (^{14}C) و شناسایی آن به وسیله کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

محمدحسن ملاح*، فرید اصغری زاده، سیدمحمدکاظم کمالی
آزمایشگاه جابر بن حیان، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۱۳۳۹-۱۴۱۵۵، تهران- ایران

واژه‌های کلیدی: رادیوکربن، کلاژن، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، بهینه‌سازی، اسیدهای آمینه، سالیابی ایزوتوپی

Optimization of Extraction Conditions of Collagen from Bone Sampl es in Radiocarbon Dating Method and its Identification by Means of High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

M.H. Mallah*, F. Asgharizadeh, S.M.K. Kamali
Jaber Ibn Hayan Lab, AEOI, P.O. Box: 14155 -1339, Tehran- Iran

Abstract: Radiocarbon dating has been considered as an important method for archeological, geological, ethnological studies, and other similar studies using bone samples. Generally, dry bone is composed of 80% inorganic components and 20% collagen, giving good results in radiocarbon analyses and it is applied in most of the credible radioactive dating laboratories. In the present research, the extraction condition of collagen from bone samples has been studied and the optimized conditions as pH, treatment duration and the amount of extraction steps for elimination of inorganic contaminants in samples are presented. The results have shown that for the extraction process, three steps is essential to obtain the pure collagen. They are: acidic–extraction, alkalic-extraction and aqueous-acidic extraction phases. Then, the main amino acids in collagen are identified by the use of HPLC and the results have been compared with the reference sample.

Keywords*: *radiocarbon, collagen, high performance liquid chromatography, optimization, amino acids, isotope dating

* e-mail: mmallah@aeoi.org.ir
تاریخ دریافت مقاله: ۸۲/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۳/۶/۷

www.SID.ir

Archive of SID

– مقدمه

رادیوکربن یکی از متداولترین رادیوایزوتوپ‌های طبیعی با نیمه عمر طولانی است که برای سالیابی نمونه‌های باستانشناسی، نژادشناسی و زمینه‌های مشابه بکار می‌رود. روشهای مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل رادیوکربن عبارتند از [۱] :

شمارشگرهای گازی: که در آنها نمونهٔ حاوی رادیوکربن را به صورت دی‌اکسیدکربن یا متان درآورده سپس مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌دهند.

شمارشگر سوسوزن مایع: نمونه محتوی رادیوکربن پس از تبدیل به بنزن به وسیلهٔ این دستگاه شمارش می‌شود.

طیف سنجی جرمی شتاب دهنده: در این روش، نمونه رادیوایزوتوپ، جداگانه پس از عملیات شتاب‌دهی لازم شکسته شده و نسبت رادیوکربن به کربن-۱۲ تعیین می‌شود.

سالیابی با رادیوکربن، در شاخه‌های مختلف علوم کاربرد دارد. محقّقان در بسیاری از مواقع با نمونه‌های استخوان و محلهای حاوی آنها مواجه می‌شوند که لازم است آنها را مورد مطالعه قرار دهند [۲]. نمونه‌های استخوانی مورد مطالعه، معمولاً حاوی ۵۰ درصد کلسیوم فسفات، ۱۰ درصد کلسیوم کربنات، ۱۰ درصد چربی استخوانی، ۱۰ درصد مواد دیگر از جمله: کلسیوم فلوراید، پتاسیوم فسفات، نمکهای سدیوم و فلزات سنگین‌تر مانند منیزیوم و ۲۰ درصد کُلاژن می‌باشند که خود کُلاژن حاوی تقریباً ۵۰ درصد کربن است. بنابراین دستیابی به مقدار استخوان موردنیاز برای انجام دادن یک تجزیه و تحلیل سالیابی درست و دقیق با رادیوکربن به آسانی میسّر است [۳]. برای سالیابی نمونه‌های استخوانی و تجزیه و تحلیل‌های رادیوکربنی، کلاژن ماده بسیار مناسبی تشخیص داده شد. این ماده از رشته پروتئینی محکم و مقاوم مانند سیم فولادی است که از مولکولهای سه زنجیره‌ای پلی‌پپتیدی با پیوندهای هیدروژنی تشکیل یافته، بطوریکه نتایج جالب توجّهی به سبب وجود رادیوکربن درکُلاژن نمونه‌های استخوانی در آزمایشگاههای بزرگ جهان مشاهده شده است [٤]. روش‌های متعدّدی برای تهیه کُلاژن پیشنهاد شده است که در آنها آلودگی‌های بعد از واکنش کاملاً حذف نشده‌اند، یا اینکه مقدار کُلاژن اوّلیه موجود در نمونه را کاهش داده‌اند، بطوری که این امر اغلب به ایجاد خطاهایی در اندازه‌گیری رادیوکربن نمونه‌های استخوانی منجر شده است [۵]. برای شناسایی کُلاژن می‌توان از روی نوع ومقدار آمینواسیدهای موجود در ساختار آن که معمولاً ۱۸ نوع از این مونومرهای آلی می‌باشند با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، و مقایسهٔ نتایج حاصل با مقادیر آنها در نمونه‌های مرجع، که در جدول ۱ مندرج است، اقدام کرد [٦].

در این کار پژوهشی، پارامترهای مهم در استخراج کُلاژن نمونه‌های استخوانی بررسی و بهینه‌سازی شده و آمینواسیدهای اصلی آن با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مورد شناسایی قرارگرفته‌اند. روش سالیابی با رادیوکربن، ضمن تبدیل کُلاژن به بنزن به وسیلهٔ دستگاه سنتز، اندازه‌گیری و تجزیه وتحلیل رادیوکربن موجود در آن با شمارشگر سوسوزن مایع انجام گرفته است.

۲- روش کار

مواد و دستگاهها

تمام مواد شیمیایی از شرکت Aldrich خریداری شده‌اند. دستگاه گرمخانه (اتوکلاو) " مدل Gallenkamp " و دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا " مدل Waters " نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

کارهای آزمایشگاهی

نمونه‌های تازهٔ استخوان‌های گوسفند از بازار شهرستانی واقع در میدان امام حسین تهران تهیه می‌شدند. برای حذف آلودگیهای سطحی، نمونه‌ها به مدّت ٤۸ ساعت در محلول سود (۸٪) قرار داده شده‌اند و پس از خشک کردن در دمای۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدّت ٦ ساعت، و خُرد و آسیاب کردن، عمل مش‌بندی آنها با الک‌های فلزی استانداردASTM صورت گرفته است و نمونه‌های بزرگتر از ۱۲۰ میکرومتر برای ادامه کار انتخاب شده‌اند. ۲۰ گرم از این نمونه‌ها با ۳۰۰ میلی‌لیتر اسیدفسفریک

جدول ۱– مقادیر انواع آمینواسیدهای اصلی کُلاژن مرجع و استخراج شده

نوع آمینواسید	٪ آمینواسیدهای اصلی موجود در نمونه کُلاژن مرجع	٪آمینواسیدهای اصلی موجود در نمونه کُلاژن استخراج شده
هیدروکسی پرولین	۱۰/۱	۹/٦
پرولین	۱۱/٦	۱۱/۰
گلیسین	۳۱/۷	۳۱/۱
آلانین	۱۱/۳	۱۰/۷

www.SID.ir

Archive of SID

غلیظ (۸۵٪) به مدّت ۳۰ دقیقه در ضمن به همزدن مداوم در دمای آزمایشگاه مخلوط و پس از قطع همزدن، به مدّت ۲/۵ ساعت به حال خود گذاشته شد تا دو فاز سفید وخاکستری رنگ به خوبی از هم جدا شوند؛ پس از گذراندن از صافی و جداسازی آنها، فاز خاکستری ژله مانند، با سود نرمال به مدّت ۲ ساعت بهمزده شد، ژل حاصل پس از تصفیه در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک (۱۲٪) حل و به مدّت ۳ ساعت در دمای آزمایشگاه بهمزده شد. آنگاه مخلوط حاصل به مدّت ۲ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت و پس از کاهش حجم ورسیدن به ۲ میلی‌لیتر، به مدّت ٦ ساعت درون اتوکلاو دارای سیستم هواکش قوی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کُلاژن ژله مانند بدست آید.

برای شناسایی و بررسی آمینواسیدهای اصلی موجود در کُلاژن از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهّز به دستگاه نوع waters و ستون Pico. Tay C18 و آشکارساز uv در طول موج ۲۵٤ نانومتر در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. بدین ترتیب که از دو حلاّل: (۱) شامل ٦۰ درصد استونیتریل و ٤۰ درصد آب و (۲) بافر ۰/۱٤ مولار استات سدیم حاوی۰/۵ درصد تری اتیل آمین و۵ درصد استونیتریل که به وسیلهٔ اسید استیک به pH=٦/٤ رسیده است، به طریق زیر استفاده شد: برای جداسازی اسیدهای آمینه، از شست و شوی گرادیانی که در مدّت ۱۰ دقیقه از صد درصد حلاّل(۲) به ٥٤ درصد کاهش می یابد استفاده شد، سپس برای رسیدن به حالت تعادل، مدّت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه به مقدار ۹۰ درصد از حلاّل (۲) و ۱۰ درصد از حلاّل (۱) استفاده شد. پس از برقراری تعادل، مدّت ۱۵ دقیقه حلاّل (۲) عبور داده شد و بعد نمونه تزریق گردید. آنگاه شست و شوی گرادیانی حلاّل به مدّت ۱۰ دقیقه ادامه یافت. سپس به مدّت ۲ دقیقه صد درصد حلاّل (۱) و ۸ دقیقه بعد صد درصد حلاّل (۲) عبور داده شد و در نهایت نتایجی بدست آمد که در جدول ۱ درج شده‌اند.

۳- یافته‌ها و نتیجه‌گیری

آزمایش‌های مکرّری که به طریق آزمون و خطا انجام گرفته‌اند، نشان می‌دهند که شرایط استخراج کُلاژن مورد نیاز برای تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از کاربرد رادیوکربن را می‌توان طی سه مرحلهٔ زیر با بازدهی ۷۰ درصد به مدّت ۲۲ ساعت بهینه‌سازی کرد.

- استخراج اسیدی به وسیلهٔ اسید فسفریک ۸۵ درصد به مدّت ۳ ساعت به منظورحذف مقادیر زیادی از ناخالصیهای معدنی موجود در نمونه های استخوانی
- استخراج بازی به وسیلهٔ سود نرمال برای خارج کردن اسیدهای نفوذ کرده به درون ساختار استخوان (مانند هومیک اسید) به مدّت ۲ ساعت ضمن به همزدن
- استخراج در محیط آبی - اسیدی (اسید کلریدریک ۱۲٪) به مدّت ۳ ساعت ضمن به همزدن به منظور دستیابی به کُلاژن با درجهٔ خلوص بالاتر.

کارآیی و مؤثّر بودن هر یک از مراحل استخراج که به منظور رسیدن به این اهداف است به وسیلهٔ تغییرات ایجاد شده در سیستم، قابل مشاهده بوده است و مقدار بهینهٔ اسید و باز مورد استفاده، همچنین انتخاب مدّتهای استخراج ذکر شده، به منظور جلوگیری از وارد آمدن آسیب به ساختار کُلاژن مورد نیاز است. در ضمن کُلاژن استخراج شده با دستگاه سنتز بنزن به محصولی با درجهٔ خلوص بسیار بالا، که مورد نیاز برای عمل سالیابی با رادیوکربن بوده تبدیل شد. برای پی بردن به کیفیت نمونهٔ استخراج شده، کُلاژن حاصل با دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت بطوری که آمینواسیدهای اصلی کُلاژن حاصل که در جدول ۱ دیده می‌شوند در مقایسه با نمونه مرجع در همان جدول، نشان می‌دهدکه همسانی خوبی بین آنها وجود دارد و اندک تفاوت موجود ممکن است به علّت خطای حاصل از روش "کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا" برای جداسازی و اندازه‌گیری آمینواسیدها وهمچنین عدم خلوص صد درصد محصول بدست آمده باشد. در خاتمه، روش استخراج کُلاژن مورد مطالعه، به منظور سالیابی نمونه های استخوانی متعلّق به زمانها و مکانهای متفاوت، به عنوان روشی ساده، ارزان، دقیق و قابل اطمینان در آزمایشگاههای رادیوکربن پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

از آقای فریدون افلاکی کارشناس بخش شیمی تجزیه مرکز تحقیقات هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران که در انجام آزمایشهای کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، ما را یاری داده‌اند سپاسگذاری و قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1. R.E.M. Hedges and I.A Law, "The radiocarbon dating of bone," Appl. Geochem. **4**, 249-253 (1989).

2. W.S.J.R. Thomas, A.J.T. Jull, B. Klaus, C.D. Raymond, D. Douglas, "Study of bone radiocarbon dating accuracy at the university of Arizona nsf accelerator facility for radioisotope analysis," radiocarbon.**29(1)**, 24-44 (1987).

3. H. Sellstedt, L. Engstrand and N.G. Gejvall, "New application of radiocarbon dating to collagen residue in bones", Nature.**212**, 572-474 (1966).

4. R. Berger, A.G. Horney, W.F. Libby, "Radiocarbon dating of bone and shell from their organic components," Science. **144**, 999-1001 (1964).

5. R. Longin,"New method of collagen extraction for radiocarbon dating," Nature.**230**, 241-242 (1971).

6. G.J.V. Klinken and W.G. Mook, "Preparative high-performance liquid chromatographic separation of individual amino acids derived from fossil bone collagen," Radiocarbon. **32(2)**, 155-164 (1990).

www.SID.ir