ترجمه فا

TarjomeFa.Com

ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

ارزیابی روش‌های استخراج کلاژن برای تحلیل ایزوتوپ‌های پایدار در مطالعات رژیم غذایی

چکیده

هدف ویژه این مطالعه، مقایسه سه روش متفاوت استخراج کلاژن مورد استفاده در آزمایشگاه‌های ایزوتوپی با انجام مطالعات رژیم غذایی می‌باشد. ما تفاوت‌های آن‌ها را از نظر $\delta^{13}C$ و $\delta^{15}N$، کیفیت کلاژن و عملکرد کلاژن بررسی کردیم. مطالعه ما بر اساس مواد اسکلتی حفاظت شده از دوره قرون وسطی در دانمارک است. مطالعه ما نشان می‌دهد که یک تفاوت معنی دار سیستماتیک در عملکرد ومقدار $\delta^{13}C$ بین سه روش وجود دارد. استفاده از روش دنیرو و اپشتین (دنیرو، اپشتین 1981، تأثیر رژیم غذایی بر روی توزیع ایزوتوپ‌های نیتروژن در حیوانات، مجله Geochimica et Cosmochimica Acta 45, 341e351) با NaOH به عنوان یک عامل پاک کننده، بر طبق مطالعه ما مقادیر $\bar{\delta}^{13}C$ را بدست می‌دهد که به طور میانگین $\pm 0.32‰$ مثبت‌تر از استفاده از روش اولترافیلتراسیون است (براون تی ای، نلسون، دی. ای ووگل، جی. اس. ستون، جی. آر 1988، بهبود استخراج کلاژن با روش اصلاح شده لانگین، مجله رادیوکربن 177-171 ,(2) 30، اصلاح شده توسط ریچارد، ام.پی، هدچ .R.E.M 1999، شواهد ایزوتوپ پایدار برای تشابهات در انواع غذاهای دریایی مورد استفاده توسط انسان‌های اواخر دوره میانسنگی در امتداد ساحل اتلانتیک اروپا، مجله علوم باستان شناسی 26, 722-717). سومین روش، که یک نسخه اصلاح شده روش دوم است، فاقد مرحله اولترافیلتراسیون می‌باشد. اگرچه تفاوت‌های بین روش‌ها بسیار اندک است، ما به این نتیجه رسیدیم که استفاده از تحلیل ایزوتوپ‌های پایدار در مطالعات تعیین غذا نیازمند استفاده از روش‌های معمول برای تهیه و اندازه گیری نمونه‌ها است.

کلمات کلیدی: روش‌های استخراج کلاژن، دیرین تغذیه، کربن، نیتروژن

1-مقدمه

تحلیل‌های ایزوتوپ پایدار $\delta^{13}C$ و $\delta^{15}N$ اندازه گیری شده در کلاژن استخوان معمولاً برای بازسازی الگوهای رژیم غذایی و معیشت باستان استفاده می‌شوند (امبروز 1993، باکرنز و همکاران 2006، هانچ و همکاران 2006، جی و ریچاردز 2006، کاتنزبر 2000، ریچاردز و همکاران 1998). برای تولید نمونه‌های استخوانی برای تحلیل ایزوتوپ، روش‌های متعددی توسعه یافته است. بیشتر این روش‌ها، عواملی نظیر هومیک اسید و لیپیدهایی که می‌توانند بر صحت (تکرار پذیرِ) اندازه گیری‌ها اثر بگذارند را در نظر می‌گیرند (برانک رامزی و همکاران 2004، براون و همکاران 1998، کولینز و گالی 1998، گاروی ولاک و همکاران 2004، لیدن و همکاران 1995، نیلسن مارش و هدچ 2000، سمال و اربان 1995).

به طور کلی بر طبق گفته لانگین (1979)، روش‌های استخراج شامل انحلال ماتریس معدنی در یک محلول HCL، انحلال پذیری کلاژن در دمای بالا در محلول HCL ضعیف و سپس روش خشک کردن انجمادی کلاژن باقی مانده استفاده شد. با این حال، اصلاحات متعددی از جمله افزودن یک مرحله تیماری با NAOH برای حذف هومیک اسید قبل از انحلال پذیری کلاژن (دنیرو و اپشتین 1981) و یا استفاده از اولترافیلتراسیون برای تخلیص کلاژن محلول وجود دارد (براون و همکاران 1988). این توصیه‌ها معمولاً موسوم به مراحل پاک سازی برای اندازه گیری کلاژن اصلی مورد استفاده در مطالعات رژیم غذایی می‌باشند.

رویکردهای شیمیایی متنوعی در تهیه نمونه‌های مورد استفاده توسط ازمایشگاه های ایزوتوپ پایدار متفاوت وجود دارد. با این حال، صرف نظر از مراحل، ازمایشگاه ها از نتایج یک دیگر به صورت منابع و مقایسه در مطالعات رژیم غذایی استفاده می‌کنند (بیلیس و همکاران 2004، جورکوف 2002، کیگان 1989). مطالعات قبلی بر روی این روش‌های استخراج به بررسی اثرات اولترافیلتراسیون در سن یابی رادیوکربن و تأثیر لیپیدها بر روی مقادیر ایزوتوپ کربنی پایدار (برانک رامزی و همکاران 2004، لیدن وهمکاران 1995) پرداخته‌اند. نتایج نشانداده است که اولترافیلتراسیون موجب می‌شود تا ذرات الاینده بزرگ‌تر باقی بمانند و لپیید ها موجب تغییر سیگنال‌های کربن می‌شوند. از این روی بررسی این که آیا روش‌های استخراج و مراحل پاک سازی بر نتایج ایزوتوپی و تفسیر تغییرات رژیم غذایی تأثیر می‌گذارند یا خیر، لازم است.

هدف ویژه این مطالعه مقایسه سه روش تهیه نمونه بر روی مواد اسکلتی حفاظت شده با ارزیابی تفاوت‌های حاصله در $\delta^{13}C$ و $\delta^{15}N$ ، کیفیت کلاژن و عملکرد کلاژن می‌باشد. اولین روش A شامل تیمار با NaOH، دومین روش B شامل هر دو اولترافیلتراسیون و فیلتراسیون با فیلترهای جداکننده Ezee(5-8 میکرومتر) قبل از خشک کردن انجمادی توصیف شده توسط ریچارد و هدج (1999) و مالدنر و ریچارد (2005) می‌باشد. سومین روش (C) نسخه اصلاحشده روش B با حذف مرحله اولترافیلتراسیون می‌باشد. این نسخه اصلاح شده روش B در ازمایشگاه های تحلیل ایزوتوپ پایدار با استفاده از مطالعات رژیم غذایی استفاده می‌شود (هانچ و همکاران 2006).

2-مواد و روش‌ها

نمونه‌های استخوانی انتخاب شده برای این مطالعه، از یک مجموعه اسکلتی مشخص از گورستان قرون وسطی Ahlgade 15e17 در هالبک دانمارک (ازموسن 1997) جمع اوری شد. گورستان بین 1100-1573 پس از میلاد استفادهشده و دارای بیش از 700 اسکلت مدفون در خاک رس است. این مواد به دلیل وضعیت حفاظتی عالی خود انتخاب شدند (استخوان‌ها از نظر ماکروسکوپی با ساختارهای سخت سالم باقی مانده بودند). هشت نمونه استخوانی از پنج نفر با سه روش استخراج، استخراج شد. جزییات مربوط به نمونه‌ها، از جمله سن و جنسیت افراد در جدول 1 نشان داده شده است.

جدول 1: جزییات نمونه‌ها

افراد	شماره نمونه	جنسیت	سن (سال)	قسمت استخوان	ساختار استخوان
EG141	1	مرد	45+	استخوان ران	ps
EG155			9		s
EG160	2	زن	45+	استخوان ران	p
					p
EG161	3	زن	18–25	استخوان ران	p
EG295			18–25		cp
	4	مرد		استخوان بازو	cp
	5				cp

	6 7 8			استخوان ران استخوان ران استخوان بازو دنده	

R: راست، L: چپ، ساختار استخوان در هنگام سوراخ شدن، P: پودر، Ps: پودر، و تراشه‌ها، S: تراشه‌ها، cp: پودر درشت

نمونه‌های استخوان کورتیکولی از قسمت پسین استخوان ران و بازو گرفته شد. سطح نمونه‌های استخوان با یک کاتر اسیابی گرد پاک سازی شد. پودر استخوان با استفاده از دریل Proxxon MICROMOT 40E با سرعت پایین (قطر دریل:2 میلی متر) بدست آمد. نمونه‌های استخوانی حاصله متشکل از پودر استخوان ریز (دانه‌های با قطر تقریبی 0.01 میلی متر)، p ترکیبی از پودر و تراشه‌های کوچک استخوان با اندازه 0.1-0.5 میلی متر، تراشه‌های با اندازه 0.9-1 میلی متر بودند. یک قطعه از دنده و تراشه‌های استخوان ران و بازو (نمونه‌های 6-7-8) به طور دستی در هاون به پودر دانه درشت 0.04-0.9 میلی متر اسیاب شدند. نمونه‌های مربوط به هراستخوان به سه بخش تقسیم شده و سه روش استخراج استفاده شد.

2-1 روش استخراج A

این روش استخراج بر اساس پروتوکل دنیرو و اپشتین 1981 است. املاح معدنی نمونه‌های استخوانی در 1 مول هیدروکلرید اسید در دمای 4 درجه به مدت 1 ساعت گرفته شده و هر 5 دقیقه یک بار همزده شد. آن‌ها تا زمان رسیدن به PH خنثی با آب مقطر آب کشی شدند. HCL به لوله‌های نمونه افزوده شد تا PH برابر با 2.5 بدست بیاید. نمونه‌ها سپس پوشش داده شده و در این محلول اسید ضعیف در دمای 70 درجه به مدت 16 ساعت برای تغلیظ اجزای پروتین ژلاتینه شدند. پس از حذف بقایای نامحلول با سانتریفیوژ نمونه‌ها در 2500 دور بر دقیقه به مدت 10 دقیقه، محلول سوپرناتانت باقی مانده در 100 درجه به مدت 6 ساعت تا زمان رسیدن به 3 میلی لیتر بخار شد. سپس محلول به مدت 24 ساعت انجماد خشک شد.

2-2 روش استخراج B

کلاژن با استفاده از روش‌های استاندارد براون و همکاران 1988، که توسط ریچاردز و هدچس (1999) با استفاده از فیلتر گریز ازمرکز(Millipore Amicon Ultra-4 (30,000 NMWL قبل از روش خشک سازی انجمادی استخراج شد. به طوری که مولکول‌های بزرگ‌تر از 3 کیلو دالتون باقی ماندند. همانند روش A، املاح نمونه‌ها در 1 مول HCL در دمای 4 درجه به مدت 1.5-10 ساعت گرفته شد تا زمانی که ازاد سازی دی اکسید کربن متوقف شود. استفاده از 1 مول HCL بهتر از 0.5 مول HCL است که غالباً استفاده شود (ریچاردز و هدجس 1999). سپس نمونه‌ها با PH خنثی با آب مقطر آب کشی شدند. محلول HCL ضعیف برای بدست آوردن PH به میزان 2.5 افزوده شد. سپس نمونه‌ها در 70 درجه به مدت 24 ساعت ژلاتینه شدند. پس از انحلال پذیری کلاژن، بقایای نامحلول با فیلتر Ezee 5-8 میکرومتر حذف شدند. محلول باقی مانده بر روی اولترافیلتر ها با سانتریفیوژ در 2500 دور بر دقیقه تغلیظ شد. سوپرناتانت کلاژن تخلیص شده (بیش از 30 کیلودالتون) به مدت 48 ساعت انجماد خشک شد.

3-2 روش استخراج C

روش C مطابق با پروتوکل روش B بود با این حال در این مرحله اولترافیلتراسیون حذف شد. استخراج کلاژن در ازمایشگاه انجام شد. همه اندازه گیری‌های ایزوتوپی با دوتکرار با طیف سنج جرمی ایزوتوپ پایدار ایزوپرایم ابزارهای GV همراه با انالیزور عنصری یوروکتور در ازمایشگاه AMS در موسسه فیزیک و نجوم دانشگاه ارهوس دانمارک صورت گرفتند. کلاژن هر نمونه دو بار بین 215-250 میکروگرم وزن شدند. برای بررسی صحت و دقت روش‌های تحلیلی، ماده ژلاتین استاندارد و مرجع استاندارد AMS(استخوانتولید شده با روش A) با $\delta^{13}C$ و $\delta^{15}N$ همراه بانمونه های کلاژن استخوان تحلیل شد. این استانداردهای ثانویه با استانداردهای ایزوتوپی واسنجی شد. حداکثر خطای تحلیلی (1σ) برای $\delta^{13}C$ و $\delta^{15}N$ به ترتیب 0.15 و 0.3 درصد بود.

تحلیل‌های آماری تفصیلی بر اساس روش‌های بلاند و التمن (1986) برای ارزیابی سه روش اماده سازی صورت گرفت. تست‌های فریدمن و تست‌های T جفت شده برای تست تفاوت در نسبت اتمی C:N، $\delta^{13}C$ و و درصد کلاژن بین روش‌ها به کار بردهشد (التمن 1999).

3-نتایج

نتایج اندازه گیری‌های ایزوتوپ پایدار و تحلیل تفصیلی در جداول 2-4 و شکل 1-2 خلاصه شده است.

3-1 نگهداری کلاژن

بر اساس شاخص‌های کیفیتی عصاره‌های کلاژن استخوان (امبروز 1990، 1993، شومینگر و همکاران 1989، وان کلینکن 1999)، عملکرد کلاژن، نسبت اتمی C:N و درصد کربن و نیتروژن برای هر سه روش به صورت یکسان در نظر گرفته شد، در حالی که عملکرد کلاژن بین سه روش بسیار متغیر بود (جدول 2).

کم‌ترین درصد کلاژن متغیر از 1.2 تا 5.7 درصد با استفاده از روش B بدست آمد. روش A منجر به تولید کلاژن بین 3.5 تا 16.7 درصد و روش C از 4.2 تا 20.6 درصد شد. با این حال، درصد کربن با وزن نمونه‌های کلاژن نسبتاً ثابت بود (جدول 2):41.1-44.7 درصد (میانگین:43.1 درصد) برای روش A، 44.3-47.5 درصد (میانگین 45.8 درصد) برای روش B و 39.5-45.5 درصد (میانگین 43.8 درصد) برای روش C بود. این موضوع در خصوص درصد نیتروژن نیز صدق می‌کرد: 15-16.6 درصد (میانگین 15.7 درصد) برایروش A، 15.5 -16.8 درصد (میانگین 15.9 درصد) برای روش B و 14-16.5 درصد (میانگین 15.4 درصد) برای روش C بود.

3-2 مقادیر $\delta^{13}C$

نتایج اندازه گیر یهای $\delta^{13}C$ نشان داد که نمونه‌های تولید شده بر طبق روش A دارای مقادیری است که نسبت به نمونه‌های تولید شده با روش B، کم‌تر منفی است و روش c دارای مقادیر بین این دو است (جدول، شکل 1). تفاوت‌ها ازنظر آماری معنی دار بودند (FTS=14.250، P=0.001). تحلیل تفصیلی تفاوت‌های بین روش‌ها

نشان داد که تفاوت معنی داری بین همه سه روش وجود دارد (جدول 3) اگرچه این تفاوت از نظر عددی کوچک است: بزرگ‌ترین تفاوت بین روش‌های A-B با تفاوت میانگین $0.32 \pm 0.22‰\ (2\sigma)$ وجود داشت.

جدول 2: نتایج ایزوتوپی نمونه‌های استخراج شده با روش A-B-C

Sample no.	$\delta^{13}C$			%C			$\delta^{15}N$			%N			C:N			% Yield		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	−18.99	−19.25	−19.28	44.4	46.6	44.0	12.43	12.77	12.40	15.7	16.0	15.8	3.3	3.4	3.2	13.50	2.79	18.43
2	−19.02	−19.38	−19.26	44.7	47.5	44.5	12.04	12.51	12.20	15.8	16.8	16.5	3.3	3.3	3.1	16.70	5.70	20.63
3	−20.25	−20.41	−20.40	41.1	45.9	39.5	10.92	11.26	11.18	15.0	16.4	14.0	3.2	3.3	3.3	6.60	1.80	6.30
4	−20.23	−20.54	−20.36	42.5	46.2	45.5	10.63	11.25	11.30	16.0	15.9	16.2	3.1	3.4	3.3	7.60	2.48	7.30
5	−18.82	−19.20	−19.13	43.0	46.2	42.3	12.26	12.47	12.28	15.9	16.2	14.9	3.2	3.3	3.3	4.47	1.20	4.50
6	−18.48	−18.86	−18.59	42.1	45.5	42.4	13.39	13.47	13.47	15.1	15.5	14.9	3.3	3.4	3.3	3.50	1.32	4.30
7	−18.57	−19.04	−18.67	43.3	44.5	42.4	13.17	13.36	12.79	16.6	15.7	15.9	3.1	3.3	3.1	10.20	2.10	4.20
8	−18.60	−18.99	−18.65	43.3	44.3	42.1	13.30	12.79	14.11	15.7	15.5	15.0	3.2	3.3	3.3	15.60	3.50	4.20

$\delta^{13}C$ و $\delta^{15}N$ در دو تکرار در مرکز سن یابی AMS، دانشکده فیزیک و نجوم، دانشگاهارهوس دانمارک، خطای تحلیلی حداکثر، (1σ) برای $\delta^{13}C$ و $\delta^{15}N$ به میزان $0.15‰$ و $0.3‰$ اندازه گیری شدند.

جدول 3: تحلیل تفصیلی تفاوت در مقادیر $\delta^{13}C$ بین روش‌ها

$\delta^{13}C$	Mean difference	2σ	t	p
Method A vs. B	0.32‰	0.22‰	8.195	<0.001
Method A vs. C	0.15‰	0.20‰	4.311	0.004
Method B vs. C	−0.17‰	0.30‰	3.140	0.016

3-3 مقادیر $\delta^{15}N$

تحلیل اندازه گیری‌های $\delta^{15}N$ بین روش‌ها و تفاوت آن‌ها به طور مشابه انجام شد. هیچ تفاوت معنی دار آماری در مقادیر $\delta^{15}N$ بین روش‌های فوق وجود نداشت (جدول 4، شکل 2).

4-بحث

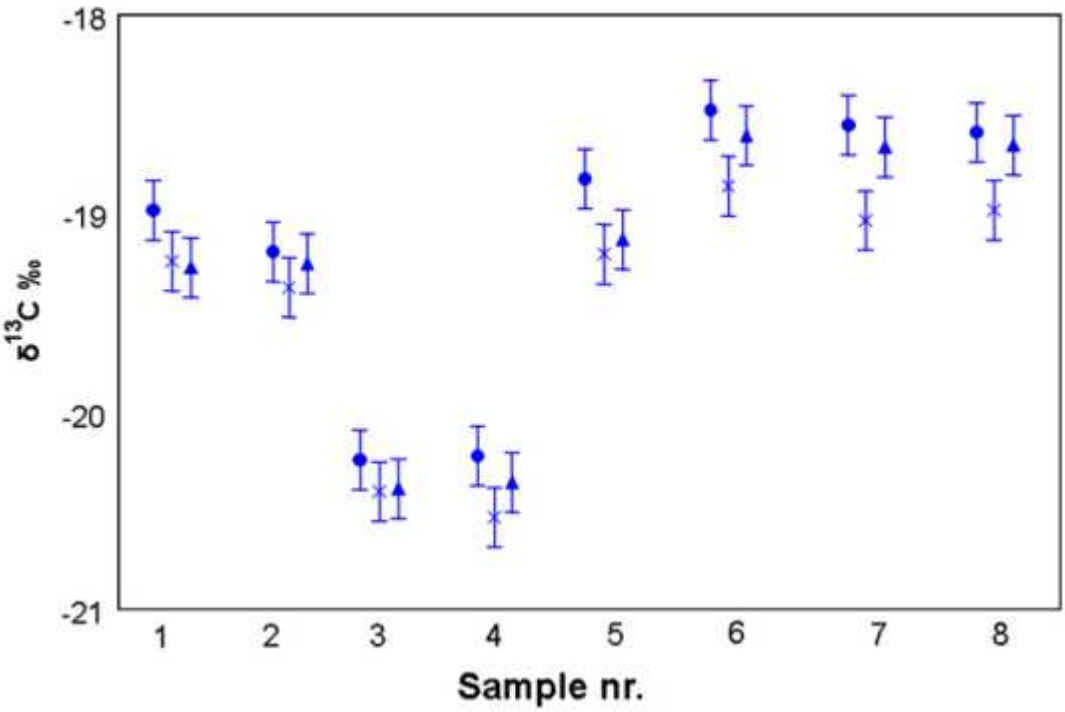
هنگام کار با کلاژن استخوان‌های باستانی، آشنایی با مکانیسم‌های تغییر دهنده سیگنال ایزوتوپیک و نیز شاخصهای کیفی موجود برای ارزیابی حفظ کلاژن لازم است. منبع الاینده های تجزیه کننده مواد معدنی استخوان (یعنی حملات میکروبی، PH، فعالیت آب زیر زمینی و دما) بستگی به محیط دفن داشته و از دیدگاه جغرافیایی و زمانی متغیر است (هدجس 2002، نیلسن و مارش و هدجس 2000). قبل از به کار گیری روش

آماده سازی مطلوب، بایستی منابع احتمالی تشخیص و الاینده های محیط دفن که موجب تغییر سیگنال ایزوتوپی می‌شوند را در نظر بگیرد. امروزه بسیاری از مطالعات ایزوتوپیک (ازجمله مطالعات تغذیه‌ای) از معیارهای ارائه شده توسط امبروز (1990، 1993) و وان کلینکن (1999) برای کلاژن حفاظت شده استفاده می‌کنند. روش‌های B-C به طور گسترده در ازمایشگاه های رادیوکربن و نیز تحلیل‌های ایزوتوپیپایدار استفاده می‌شوند) برانک رامسی و همکاران 2004، هانچ و همکاران 2006، ریچاردز و همکاران 2006، ریچاردز و هدجس 1999). چون چندین روش و پروتوکل استخراج وجود دارند، مهم است که نتایج بدست آمده یکسان و مشابه باشند. کیفیت کلاژن نیز بایستی مقایسه شود زیرا بر نتایج تأثیر دارد. درصد تولید کلاژن نیز یک معیار است ولی یک عامل مهم و تعیین کننده نیست. البته، روش استخراج ایده آل بایستی تولید کلاژن را به حداکثر رسانده، ضمن این که بقایای پروتین و الاینده ها را به حداقل برساند. با استفاده از روش B، عملکرد پپتیدها بایستی بهبود یابد زیرا الاینده ها موجب کاهش وزن مولکولی می‌شوند.

جدول 4: تحلیل قیاسی تفاوت در مقادیر $\delta^{15}N$ بین روش‌ها

$\delta^{15}N$	Mean difference	2σ	t	p
Method A vs. B	−0.22‰	0.68‰	−1.814	0.112
Method A vs. C	−0.20‰	0.77‰	−1.462	0.187
Method B vs. C	0.019‰	1.16‰	0.092	0.930

اختلاف میانگین



شکل 1: $\delta^{13}C$ ‰ نمونه‌های تولید شده با روش $B = \times$ ، $A = \bullet$ و $C = \blacktriangle$. همه نمونه‌ها دارای حداکثر خطای تحلیلی $1\sigma = \pm 0.15$‰ می‌باشند.

انتظار می‌رفت که مقدار تولید کلاژن تا حدودی برای نمونه‌های استخراج شده با روش B کم‌تر باشد زیرا استفاده از اولترا فیلترها موجب کاهش عملکرد کلی با حذف مولکول‌های کوچکتر از 30 کیلودالتون می‌شوند. تحلیل کاهش کلاژن در زمان اولترا فیلترینگ انجام شد. تحلیل نشان داد که تولید کلاژن به بیش از 86 درصد کاهش یافت. کم‌ترین تولید کلاژن مربوط به نمونه استخوان شماره 5 بود و مقدار کلاژن 1.2 درصد با روش B و 4.47 درصد با روش A بود. این نمونه از استخوان ران گرفته شده و تولید پودر ریز در طی سوراخ کردن نمونه استخوان کرد. ماهیت پودری نمونه استخراج شده نشان می‌دهد که کلاژن به خوبی حفظ نشده است و عملکرد پایین آن موید همین نتیجه است. بر عکس، نمونه استخوان شماره 2 تولید تراشه می‌کند. کیفیت تراشه‌های استخوان نشان دهنده حفظ خوب کلاژن است. این در حالی است که کمی سازی بین سایت‌ها مشکل است. این فرض با تولید کلاژن بالا برای همهسه روش تأیید شد. روش B در این استخوان کم‌ترین عملکرد را داشت. هم چنین این احتمالاً ناشی از از دست رفت کلاژن از طریق اولترا فیلتر است. با این حال پودر P تنها شاخص حفظ کلاژن ضعیف در استخوان نیست. نمونه‌های استخوان تولید شده از پودر دانه درشت دارای عملکرد کلاژن پایین

است. شونینگر و همکاران (1989) گزارش کرده‌اند که در صورتی عملکرد بالای کلاژن حاصل می‌شود که از پودر سازی اجتناب شود با این حال آن‌ها بیان کرده‌اند که ظاهر و تولید کلاژن و نسبت اتمی C:N را نمی‌توان برای پیش بینی شیوه حفظ کلاژن استفاده کرد. با این حال در نمونه‌های با نگه داری ضعیف، تولید تراشه به جای پودر بهتر است زیرا شانس تولید کلاژن سالم بیشتر است چرا که ساختار الیاف کلاژن حفظ می‌شود. کولینز و گالی (1998) نیز نشان دادند که اسیاب کردن استخوان به کلاژن آسیب می زند. اهمیت کلاژن آسیب دیده به مراتب کم‌تر است زیرا تعداد یادی از الیاف کلاژن طویل و سخت بریده می‌شوند. مقدار بالای درصد نیتروژن وکربن اندازه گیری شده در مولکول‌های بزرگ روش B، نشان دهنده دو چیز است: یا کلاژن استخوان اصلی آلوده است و یا این که کلاژن اصلی دارای اندازه مولکولی کم‌تر از 30 کیلودالتون است و آن چه که باقی می‌ماند، آلودگی است.

اولترافیلتر ها با 0.1 N NaOH از قبل آب کشی شدند و دو بار با آب مقطر سانتریفیوژ گردیدند. آلاینده‌هایی که می‌توانند منجر به اختلال شوند بایستی در این مرحله حذف شوند. مطالعات در واحد رادیوکربن آکسفورد (برانک رامزی و همکاران 2004) نشان داده‌اند که این آکشی برای حذف الاینده ها کافی نیست و این که پروتوکل پاک سازی پیشنهادی توسط تولید کننده منجر به افزایش نسبت اتمی C:N نسبت به کلاژن اصلی می‌شود. نسبت اتمی C:N در دامنه 2.9-3.6 یک شاخصی از حفاظت خوب کلاژن است (امبروز 1990). مشابه با نتایج C:N، (جدول 2)، نسبت اتمی اولیه C:N برای هر یک از روش‌های پاک سازی، در حدود قابل قبول بوده است زیرا نسبت مطلق آلودگی بسیار پایین است. همه آزمایشگاه‌ها قادر اجرای این پروتکل پاک سازی اولترافیلترها نمی‌باشند زیرا هم زمان بر وهم پر هزینه است.

نمونه‌های تیمار شده با NaOH (A) دارای نسبت‌های اتمی 3.1-3.3 بودند و نمونه‌های اولترافیلتر شده دارای نسبت‌های اتمیC:N بین 3.3 -3.4 بودند. بزرگ‌ترین تفاوت بین دو روش برای نمونه 4 با نسبت C:N 3.1 و 3.5 برای A-B بود.

این که چرا نمونه‌های استخراج شده با استفاده از روش C دارای مقدار نیتروژن و کربن کم‌تری در زمان استفاده از فیلتر Ezee می‌باشند هنوز مشخص نشده است. بر طبق دیتابیس کربن 14 آکسفورد (وان کلینکن 1999)

درصد مقادیر کربن ونیتروژن کلاژن سالم به ترتیب 34.8 ± 8.8 و $11-16$ درصد وزنی بود. مقادیر بالا نشان دهنده افزایش کربن الی با مقادیر پایین مواد غیر الی است که در عصاره‌ها انتظار می‌رود (امبروز 1990). و چون باقی مانده نشانگرهای کیفیت نشاندهنده کلاژن خوب هستند، کلاژن نبایستی برای تحلیل رد شود. استفاده از NaOH در روش A موجب حذف الاینده های غیر پروتینی می‌شود زیرا نمونه‌ها دارای مقادیر کربن و نیتروژن در بازه قابل قبول به ترتیب 41.1-44.7 درصد و 14-16 درصد می‌باشند.

یک تفاوت سیستماتیک و معنی دار (ولو کوچک) در مقادیر $\delta^{13}C$ روش‌ها وجود دارد. استفاده از روش A با NaOH به عنوان یک عامل پاک کننده بر طبق این مطالعه، تولید مقادیر $\delta^{13}C$ می‌کند که به طور متوسط 0.32 مثبت‌تر از استفاده از روش اولترافیلتراسیون (رو. ش B) است. مطالعه ما هیچ گونه تفاوت معنی داری را در مقادیر $\delta^{15}N$ نشان نداد. تغییر در $\delta^{15}N$ بین روش‌های نمونه برداری استخوان شماره 8 نیز بایستی مورد توجه قرار گیرد. این نمونه از استخوان دنده (ترابکالر) گرفته شده است. سایر هفت نمونه از بخش کورتیکول استخوان‌های بلند (استخوان فشرده) گرفته شده است. چون استخوان دنده، سریع‌تر از استخوان‌های دیگر آلوده می‌شود، تغییر در $\delta^{15}N$ بین روش‌ها نشان می‌دهد که روش C موجب حذف الاینده ها و نیز روش A-B نمی‌شود که دارای مقادیر مشابه‌تر $\delta^{15}N$ برای این نمونه استخوان بودند.

نمونه‌های استخراج شده با استفاده از روش B دارای الاینده های غیر پروتینی ناخواسته‌ای می‌باشند که در مرحله اولترافیلتراسیون حذف شدند. در این مطالعه، تیمار با NaOH موجب حذف الاینده های غیر پروتینی (الایندههای محلول نظیر اسید هیومیک) بهتر از اولترافیلتر بر روی موادی که دارای مولکول‌های کم‌تر از 3 کیلودالتون هستند می‌شود. این خود تولید بقایایی می‌کند که عمدتاً ناشی ازکلاژن هستند ولی دارای مواد الی و معدنی خارجی می‌باشند. اثر این‌ها بر روی مواد اسکلتی حفظ شده، ناچیز است.

وجود لیپیدها موجب اریبی در نتایج $\delta^{13}C$ می‌شود زیرا لیپیدها دارای مقادیر $\delta^{13}C$ می‌باشند که منفی‌تر از پروتین هاست (لیدن و همکاران 1995). با این حال، درجه تداخل بستگی به مقدار لیپید حفظ شده در استخوان دارد. در این صورت، ما به تحلیل مواد استخوانی باستانی از دوره قرون وسطی پرداخته و نتایج نشان

می‌دهد که شانس داشتن لیپیدها به اندازه نمونه‌های استخوانی جدید بالا نیست، اگرچه کلسترول در مقیاس‌های زمانی باستانی بالا بوده است (استات و اورشد 1996). بر طبق گفته لیدن و همکاران (1995)، $\delta^{13}C$ در کلاژن غیر لیپیدی به اندازه 1.8 درصد منفی‌تر از نمونه‌های کلاژن استخراج شده از لیپید است. برای اجتناب از تغییر، پیشنهاد می‌شود تا کل لیپیدها در فرایند استخراج با استفاده از یک مرحله شست و شوی حلال با متانول-کلروفرم شست و شو شوند.

روش B، مواد باوزن مولکولی بالا را انتخاب می‌کند. از آنجا که مولکولهای لیپید دارای وزن کمتر از 3 کیلودالتون دارند، اولترافیلتراسیون بایستی لیپیدهای موجود در نمونه را حذف کند. روش A تنها هومیک اسیدها را حذف مر کند. لیدن و همکاران 1995 نشان داده‌اند که تیمار با NaOH موجب کاهش کارایی کلاژن می‌شود که با نتایج این مطالعه درتضاد است.

5-نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از آنالیز ایزوتوپی پایدار در مطالعات دیرین تغذیه‌ای نیازمند استفاده از روش‌های معمول برای تولید و اندازه گیری نمونه‌هاست. این که به چه میزان این اندازه گیری‌ها موجب ایجاد اختلاف در تفسیرنتایج می‌شود هنوز مورد سؤال است. بر طبق گفته لاول و همکاران (1986)، یک تغییر طبیعی در جمعیت می‌تواند تا بیش از 0.3 درصد باشد. هر گونه تفاوت در $\delta^{13}C$ بیش از 0.3 درصد می‌تواند موجب شود تا مفسر به این نتیجه برسد که تفاوت در شیوه زندگی و معیشت افراد وجود داشته است. دنیرو شونینگر (1983) یک تغییر بین فردی بیش از 2 درصد را نشان داده است با این حال، مطالعات بر روی حیوانات با رژیم غذایی کنترل شده انجام شده‌اند و یک شیوه رضایت بخش برای برآورد تغییرات پایه در نسبت‌های ایزوتوپی انسان نمی‌باشند. اگرچه یک تفاوتدر کیفیت کلاژن با استفاده از روش‌های مختلف در این مطالعه دیده شده است و از نظر آماری معنی دار نیست، ما بر این باوریم که تاثیری بر روی تفسیر کلی نتایج ایزوتوپی ندارد. آن‌ها بااین حال بر لزوم پیوستگی در روش اماده سازی مورد استفاده و آگاهی از تفاوت‌هایی که می‌توانند ایجاد شوند تاکید کرده‌اند. طبیعتاً، در صورتی که آزمایشگاه‌ها یک سری تغییرات و اصلاحاتی را در روش‌های استخراج اعمال کنند، این موارد بایستی دقیقاً ذکر شود.

ما می دانیم که این مطالعه تنها دارای هشت نمونه از استخوان‌های حفاظت شده از گورستان قرون وسطی در دانمارک بوده است. از این روی تصور می‌شود که مطالعه آینده می‌تواند از استخوان‌های با حفاظت ضعیف و نیز مواد مربوط به مقیاس‌های مکانی و زمانی مختلف استفاده کند تا مشخص شود که این سه روش به چه میزان در حذف آلاینده‌ها مؤثر بوده‌اند.

ترجمه فا
TarjomeFa.Com

این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

✔ لیست مقالات ترجمه شده

✔ لیست مقالات ترجمه شده رایگان

✔ لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی