Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:11 IRDT on Thursday September 21st 2017

مجله دانشکده پزشکی تهران
شمارهٔ چهارم و پنجم ـ دی، بهمن ماه ۱۳۵۲ ـ صفحه ۱۲۹

کروماتوگرافی روی لایهٔ نازک (TLC) برای تشخیص اسیدهای آمینه ادرار و خون

دکتر قدسی دانشبد *

مقدمه : در بیماریهای اختلال متابولیسم اسیدهای آمینه ، افزایش یك یا چند اسید آمینه در پلاسما و یا ادرار نمودار نوع اختلال میباشد و شناختن آن اسید آمینه باعث تشخیص بیماری میگردد. در بیشتر این بیماریها بعلت تأخیر در تشخیص بیماری افزایش اسید آمینه اثرات سوء روی انساج بدن مخصوصاً مغز گذاشته میشود و باعث اختلال وعقب افتادگی مغز میگردد [۱] تشخیص زودرس و در نتیجه درمان آن جلوگیری از این اثر سوء مینماید . از طرف دیگر شناختن یك بیماری ارثی در یك خانواده کمك بزرگی از نظر احتمال مبتلاشدن فرزندان دیگر فامیل خواهد نمود و میتوان در اصلاح آن کوشید .

مشخص نمودن اختلال متابولیسم اسیدهای آمینه احتیاج به یك روش سریع ـ ساده وقابل اعتماد دارد . بیشتر اختلالات متابولیسمی اسیدهای آمینه که تاکنون شرح داده شده است اغلب با تغییرات وسیع مقدار اسیدهای آمینه نسبت به مقادیر طبیعی همراه میباشد [۲و۳] بنابراین روش ساده آزمایش (Screen) که حساسیت کافی داشته باشد برای تشخیص اولیه کافی است معمولا برای اینکار از کروماتوگرافی روی کاغذ استفاده میشود ولی چون در مایعات بیولوژیك موادی مثل پروتئینها ـ نمکها و مولکولهای خنثی مثل کربوئیدرات و اوره وجود دارد که اثر نامطلوبی روی کروماتوگرافی اسید آمینه دارند [۴] بایستی پروتئین و نمك را از مایعات بیولوژیکی نامبرده قبل از کروماتوگرافی حذف کرد.

درضمن کاربرد این روش مستلزم وقت زیادی است . تعیین اسید آمینه را مستقیماً در پلاسما [۵] یا در خون یا در ادرار [۶] بدون حذف پروتئینها و نمك میتوان به روش کروماتوگرافی روی کاغذ به شرط بکاربردن مقدار خیلی کم از آنها انجام داد و یا اینکه کروماتوگرافی روی صفحه حساس (لایه نازك) انجام گردد [۴]. کروماتوگرافی روی لایه نازك سلولز آماده شده روی صفحه آلومینیم در ۱۹۶۹ توسط Ersser شرح داده شد [۷] که بسیار ساده وسریع وحساس میباشد و به جداکردن پروتئین و نمك پلاسما وادرار احتیاجی نیست . این مقاله گزارش آزمایشاتی است که با این روش انجام شده و مناسب بودن آن تأیید شده است .

مواد و روش اجرای آزمایش : برای آزمایش از لایه نازك سلولز (۰/۱ میلیمتر ضخامت) تهیه شده روی صفحه آلومینیوم (۹/۵ × ۱۸ سانتیمتر) استفاده میگردد .
(Riedel_de Haenag Seelze_Hannover , Germany.)

نمونه‌های مورد آزمایش همراه با استاندارد و کنترل و نشانه (Marker) درفاصله ۰/۵ سانتیمتری پائین صفحه کروماتوگرافی گذاشته میشود .

محلول استاندارد مخلوطی است از اسیدهای آمینه ذیل :

هیستیدین (۲۰ میلیگرم) لیزین (۳۰ میلیگرام) گلوتامین (۷۰ میلیگرم) گلیسین (۶۰ میلیگرم) سرین (۲۰ میلیگرم) ـ تره‌اونین (۳۰ میلیگرم) ـ آلانین (۵۰ میلیگرم) ـ پرولین (۵۰ میلیگرم) ـ تیروزین (۳۰ میلیگرم) ـ والین (۴۰ میلیگرم) ـ فنیل آلانین (۳۰ میلیگرم) ـ لوسین (۶۰ میلیگرم) ـ که در محلول ۰/۱۰ ایزوپروپانل (که ۱۰۰ سی‌سی از آن حاوی یك قطره اسید کلرئیدریك باشد) حل شده است و در حالت یخزده نگاهداری میشود . یك دهم رقت آن تقریباً شبیه به غلظت این اسیدهای آمینه در پلاسما می‌باشد [۴] .

* استادیار کودکان ـ بخش طب تجربی و فارماکولوژی دانشکده پزشکی تهران

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:11 IRDT on Thursday September 21st 2017

نشانه : جوهر سیاه پارکر یك سی‌سی در ۱۲ سی‌سی ان بوتانل (N . Butanol) حل نموده سانتریفوژ شده و مایع روئی بعنوان نشانه استفاده می‌شود [۷] .

پلاسمای مورد آزمایش در حرارت زیر صفر نگاهداری میشود . از آن به مقدار ۵ میکرولیتر در روی خطی بطول ۲ سانتیمتر گذاشته میشود. ادرار که قبلا بوسیله مرتیولات نگاهداری شده (یك قطره از محلول ۰/۱ در یك لیتر) در روی خطی بطول ۱/۵ سانتیمتر گذاشته میشود. مقدار مورد آزمایش ادرار برحسب مقدار کراتی‌نین ادرار تعیین میگردد [۶] .

ستون اول مقدار کراتی‌نین به میلیگرم در صد و ستون دوم حجم ادرار به میکرولیتر است.

۰ – ۱۵	۱۶ – ۲۵	۲۶ – ۵۰	۵۱ – ۱۰۰	۱۰۱ – ۲۰۰	۲۰۱ +
۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲

پس از گذاشتن نمونه‌ها، صفحه کروماتوگرافی را با هوای گرم خشك نموده و در محلول حلال که باید روزانه تهیه گردد گذاشته میشود .

محلول حلال : ان بوتانل ۳۵ سی‌سی – استن ۳۵ سی‌سی – اسید استیك گلاسیال ۱۰ سی‌سی – آب مقطر ۲۰ سی‌سی . در محلول فوق دوبار و هر بار ۵۰ دقیقه در حرارت ۲۵ درجه کروماتوگرافی انجام میگردد . پس از خشك نمودن با هوای گرم رنگ آمیزی میگردد .

محلولهای رنگ آمیزی:

نایندهیدرین (Ninhydrin) (۰/۰۰۵ دراستن) صفحه کروماتوگرافی پس از رنگ آمیزی در حرارت ۴۰ درجه بمدت ۳۰ دقیقه گذارده می‌شود .

ایزاتین (Isatin) (۰/۰۱ دراستن) پس از رنگ آمیزی صفحه (Plate) در حرارت ۱۰۰ درجه بمدت ۵ دقیقه گذاشته می‌شود.

O – Phthalaldehyde (۰/۰۰۲ دراستن) پس از رنگ آمیزی صفحه، در حرارت ۵۰ درجه بمدت ۱۰ دقیقه گذاشته میشود.

Pauly's reagent : الف – اسید سولفانیلیك ۰/۰۹ دراسید کلرئیدریك یك نرمال .

ب – نیتریت سدیم ۰/۰۵ .

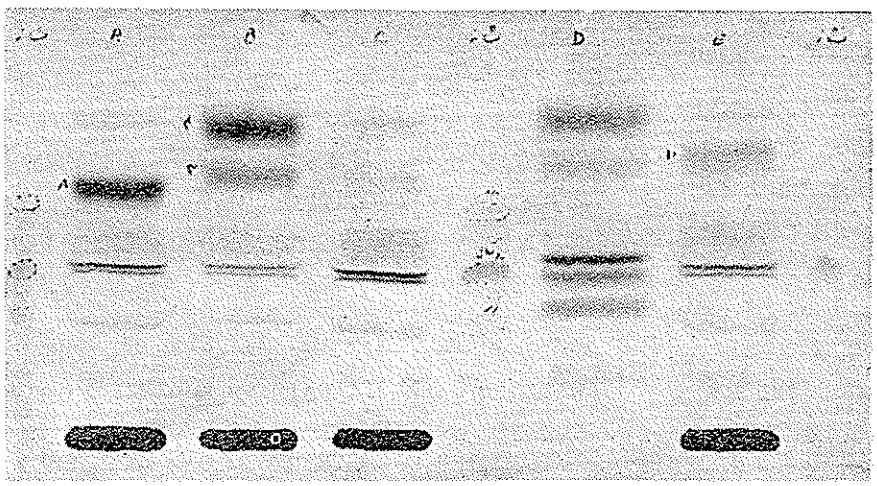
ج – محلول اشباع شده کربنات سدیم در آب .

۵ سی‌سی از الف با ۵ سی‌سی از ب مخلوط کرده پس از ۵ دقیقه ۱۵ سی‌سی از محلول ج اضافه کرده و روی صفحه کروماتوگرافی پاشیده می‌شود . تمام محلولها باید در یخچال نگاهداری شود .

Erlich reagent: ۵ سی‌سی از محلول ۰/۰۱۰ P – dimethylaminobenzaldehyde در اسید کلرئیدریك غلیظ را با ۲۰ سی‌سی استن رقیق نموده و صفحه کروماتوگرافی را رنگ نموده و چند دقیقه در گرما گذاشته میشود .

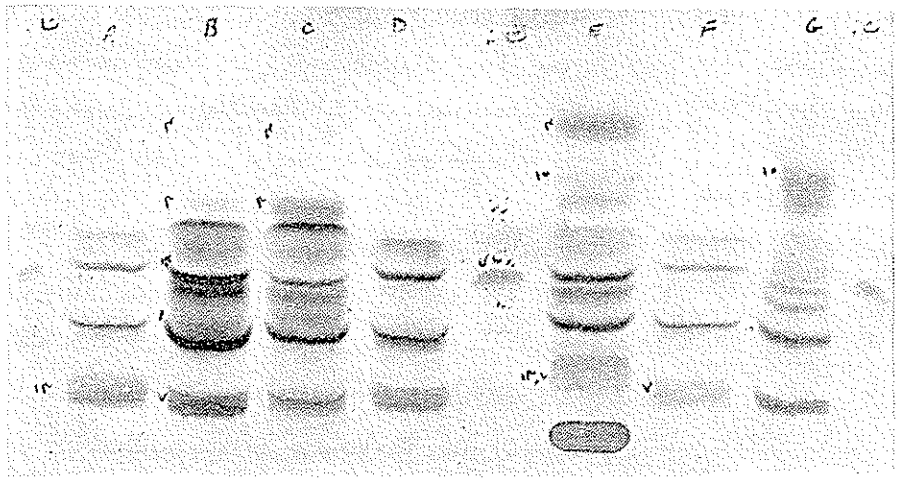
Iodo / Platinate reagent: به ۱۰ سی‌سی از محلول ۰/۰۰۱ اسید کلروپلاتینیك در اسید کلرئیدریك ۰/۲ نرمال ، ۰/۶ سی‌سی محلول یدور پتاسیم (۱۶۷ میلیگرم / سی‌سی) اضافه میگردد [۸] در موقعی که از این محلول رنگ آمیزی استفاده میشود از کروماتوگرافی روی لایه نازك سلولز تهیه شده روی پلاستیك (F . 1440 Schleicher and Schull Dussel Germany) استفاده میشود.

نتایج : محل اسید آمینه بوسیله اسید آمینه استاندارد مشخص میشود و افزایش آن با مقایسه با کنترول و استاندارد میباشد . برای تعیین غلظت تقریبی اسید آمینه از رقت‌های مختلف استاندارد میتوان استفاده نمود. عکس شماره (۱) کروماتوگرافی پلاسما و عکس شماره (۲) کروماتوگرافی ادرار را



عکس شماره ۱ – کروماتوگرافی پلاسما:
A – افزایش متیونین
B – Maple syrup urine disease
C – پلاسمای کنترول
D – پلاسمای استاندارد
E – افزایش فنیل آلانین .

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:11 IRDT on Thursday September 21st 2017



عکس شماره ۲ ــ کروماتوگرافی ادرار :
A ــ افزایش هیستیدین .
B ــ راشی تیسم تغذیه‌ای
Maple syrup urine disease—C
D ــ ادرار کنترول
E ــ سندرم فانکونی . F ــ سیستینوری
G ــ فنیل کتونوری .

نشان میدهد که بطور واضح بیماران را مشخص کرده‌است. دراین آزمایش ازاستاندارد یك‌هشتم رقیق شده استفاده شده است . در کروماتوگرافی پلاسما در نقطه شروع کروماتوگرافی هاله‌ای تشکیل میشود (عکس شماره ۱) این هاله درنمونه‌های تازه‌کمتر مشاهده میشود . علت بوجود آمدن آن مشخص نیست [۴] .

چنانچه ازعکس‌ها مشاهده‌می‌شودنشانه، سه رنگ ایجاد میکند . رنگ زرد با والین ــ رنگ پرتقالی با پرولین ورنگ قرمز باگلیسین‌حرکت میکند .

اسیدهای‌آمینه‌که درتابلو مشاهده میشوند محل آن روی عکس باشماره نشان داده شده است .

تابلو

۱ــ گلیسین	۸ ــ متیونین
۲ــ آلانین	۹ ــ گلوتامین
۳ــ والین	۱۰ــ بتافنیل آلانین
۴ــ لوسین	۱۱ ــ تیروزین
۵ــ سرین	۱۲ ــ لایزین
۶ــ تره‌اونین	۱۳ ــ هیستیدین
۷ــ سیستین	۱۴ ــ پرولین

بحث

کروماتوگرافی‌روی‌لایه‌نازك‌سلولز بامقایسه‌باکروماتوگرافی روی‌کاغذ بسیارحساس وسریع‌میباشد. [۹] واحتیاج به‌جداکردن پروتئین ونمك نیست وازاین نظرنیزدروقت صرفه‌جوئی میشود . برای خواندن‌کروماتوگرافی‌ابتدا از رنگ‌آمیزی نایندهیدرین استفاده می‌شود با این رنگ تمام اسیدهای‌آمینه غیر از پرولین رنگ بنفش بخود میگیرند . نظر باینکه بعضی اسیدهای آمینه خیلی نزدیك بهم حرکت میکنند برای مشخص نمودن‌ازرنگهای اختصاصی استفاده میشود . در رنگ‌آمیزی‌اختصاصی نمونه‌مورد آزمایش ومحلول اسیدهای‌آمینه‌که مشکوك به افزایش می‌باشند توأماً باکنترل کروماتوگرافی میشوند .

ایزاتین برای رنگ‌آمیزی پرولین بکارمی‌رود . این‌اسید آمینه با نایندهیدرین رنگ پرتقالی خیلی‌کم‌رنگ وبا ایزاتین رنگ آبی بخود میگیرد . محلول O ــ Phthalaldehyde برای‌مشخص‌نمودن‌هیستیدین‌وگلیسین‌وPauly برای‌رنگ‌آمیزی هیستیدین‌وارلیخ‌برای رنگ‌آمیزی‌تریپتوفان‌استفاده میشودرنگ یدوکلروپلاتینیك برای رنگ‌آمیزی سیستین ، سیستئین‌ومتیونین بکارمی‌رودوچون‌پلاتین‌روی‌آلومینیوم‌اثر کرده‌وپلاتین‌سیاه‌بوجود آورده وآب اکسیژنه‌آزادمی‌کند باین‌جهت برای استفاده‌ازاین رنگ‌آمیزی‌کروماتوگرافی‌روی‌سلولز آماده‌شده روی‌پلاستیك‌ویا شیشه‌انجام‌می‌گردد .لوسین وایزولوسین خیلی نزدیك‌بهم‌حرکت میکنندبرای‌مشخص‌نمودن‌این‌اسیدهای‌آمینه‌مثلادربیماری‌Maple syrup urine disease [۲] ازکروماتوگرافی یا حلال amylalcohol ــ C ، متیل اتیل‌کتون وآب [۶۰ــ۲۰ــ۲۰] استفاده میشود . این حلال خیلی آهسته حرکت می‌کند و ۹۰ دقیقه برای هربارکروماتوگرافی لازم است . بااین‌روش‌لوسین، ایزولوسین و والین بخوبی ازهم جدا میشوند .

آزمایش هم‌زمان اسیدهای‌آمینه پلاسما و ادرار درروی‌یك صفحه نازك‌کروماتوگرافی‌لازم است مخصوصاً برای تشخیص‌بین آمینواسیداوریهای ضایعه‌کلیوی ازآمینواسید دربیماری‌که‌دراثر افزایش‌اسیدهای‌آمینه‌پلاسمامیباشد[۳]. درسه‌ماه‌اول‌زندگی‌افزایش آمینواسیدوری بعلت تکامل نیافتن مکانیسم جذب لوله‌ای کلیه وجود دارد [۳] این حالت درکودکان نارس طولانیتراست[۱۰] باین‌جهت دراین‌سن برای‌کنترول ازکودکان‌هم‌سن باید استفاده نمود وچندماه بعد نیزکروماتوگرافی را تکرار کرد .

باید توجه داشت‌که بیشتر آمینواسیدوریها موقتی‌میباشند. دریك تجربه از ۳۱۶ آمینواسیدوری فقط ۶ نفر ازآنها دائمی

بوده‌اند [۱۱] ازطرف دیگرافزایش بعضی از اسیدهای آمینه که همراه با عقب افتادگی روانی است در دوران کودکی بخوبی دیده میشودولی درسالهای بعدافزایش اسیدآمینه‌ثابت‌نیست[۱۲] باین جهت آزمایش‌اسیدهای آمینه‌دراوایل طفولیت برای تشخیص لازم است .

بعضی ازشیرهای خشك حاوی مقدار فراوانی اسید آمینه مثلا D_L methionine [۱۳] میباشدکه باعث دفع آن اسید آمینه در ادرار می‌شود . دربعضی از بیماریهای غیرکلیوی نیز مثل راشی‌تیسم‌تغذیه‌ای آمینواسیدوری‌منتشردیده می‌شود [۱و۳].

برای‌مطالعه‌دقیق‌ازنظرجزئیات‌اختلال متابولیسم‌اسیدهای آمینه احتیاج به‌کروماتوگرافی دو طرفی و دستگاه جدا کننده اسیدآمینه می‌باشد . در بخش طب تجربی و فارماکولوژی از طریقه میکرومتد [۸] برای‌کروماتوگرافی دو طرفی استفاده می‌شود .

خلاصه .

مشخص‌نمودن‌اسیدهای آمینه‌پلاسماوادراردربیماران‌مبتلا به اختلالات متابولیسم کمك مهمی به‌تشخیص کلینیکی مینماید .

آزمایش‌روی‌لایه‌سلولز آماده‌شده روی آلومینیوم یك‌طریقه ساده وسریع برای تعیین اسیدهای آمینه موجود درمایعات فوق می‌باشد. دراین طریقه به‌آماده‌کردن‌قبلی وگرفتن نمك‌وپروتئین ادرار وپلاسما احتیاجی نیست .

نتایج خوبی بااین طریقه برای مشخص نمودن مواد فنیل کتونوری، سیستینوری‌وبیماری Maple syrup urine disease گرفته شده است .

***

نویسنده مقاله ازجناب‌آقای دکترناصرگیتی استاد گروه طب تجربی وفارماکولوژی‌وجناب‌آقای دکترشموئیل رهبراستاد گروه‌ایمونولوژی بخاطرکمك و راهنمائی، وخانم‌مهوش‌فرشیان برای کمکهای تکنیکی و خانم نیره ملایری برای تایپ مقاله تشکرمی‌نماید .

References

1 _ Nelson W.E., Vanghan V.C. & McKay R . J . Text book of Pediatrics. Ninth edition. Saunders, 1969.

2_ Stanbury J. B.. Wyngaarden J .B . & Frederickson D. S. (Eds.) . The metabolic basis of inherited disease. 2nd ed. New York : McGrow _ Hill book Company, 1966 .

3_ Efron M. L. New Eng. J. Med. 272 : 1058, 1965.

4_ Ersser R. S. J. Med. Lab. Technol. 27 : 142, 1970.

5_ Scriver C.R., Davies E. & Cullen A.M. Lancet, 2:230, 1964.

6_Efron M. L., Young D.,Mozer H. W: & Mac Cready R. L. New Eng. J. Med. 270 : 1378. 1964.

7_ Ersser R.S. & Seakins J.W.T. Nature, London, 223:1388, 1969.

8_ Ersser R.S. Personal communication.

9_ Raine D.N., Cooke J.R., Andrews W.A. & Mahon D.F. Brit. M.J. 3:7, 1972 .

10_ Woolf L.J. & Norman A. P. J. Ped 50:271, 1957.

11_ Clow C. & Scriver C.R. Amer. J. Dis. Child. 117:48, 1969 .

12_ Griffittes. Arch. Dis. Childh. 46:881 , 1971 .

13- Efron M.L., McPherson T.C., Shih V.E., Welsh C.F. & MacCready R.A. Amer. J. Dis. Child. 117:104. 1969 .

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 6:11 IRDT on Thursday September 21st 2017