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 و عقب 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 و قابل 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 [۲ و ۳] 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 حساستر (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 و سریع و حساس میباشد و به جداکردن پروتئین و نمك پلاسما و ادرار 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) در فاصله 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

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

پلاسمای مورد آزمایش در حرارت زیر صفر نگاهداری میشود . ازآن به مقدار ۵ میکرولیتر در روی خطی بطول ۲ سانتیمتر گذاشته میشود. ادرارکه‌قبلا بوسیله مرتیولات نگاهداری شده (یك قطره ازمحلول ۰/۱ دریك لیتر) در روی خطی بطول ۱/۵ سانتیمتر گذاشته‌میشود. مقدار مورد آزمایش ادرار برحسب مقدار کراتی‌نین ادرار تعیین میگردد [۶] .

ستون اول مقدار کراتی‌نین به‌میلیگرم درصد و ستون دوم حجم ادرار به میکرولیتر است.

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

پس‌ازگذاشتن نمونه‌ها، صفحه کروماتوگرافی رابا هوای گرم خشك نموده و در محلول حلال که باید روزانه تهیه گردد گذاشته میشود .

محلول حلال : ان‌بوتانل 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 . پس‌ازخشك نمودن‌باهوای گرم رنگ آمیزی میگردد .

محلولهای رنگ‌آمیزی:

نایِن‌هیدرین (Ninhydrin) (۰/۰۲۵ دراستن)صفحه کروماتوگرافی پس‌از رنگ‌آمیزی درحرارت ۴۰ درجه بمدت ۳۰دقیقه گذارده‌می‌شود .

ایزاتین (Isatin) (۰/۱ دراستن) پس از رنگ آمیزی صفحه (Plate)درحرارت ۱۰۰ درجه‌بمدت ۵دقیقه‌گذاشته می‌شود.

O –Phthalaldehyde (۰/۰۲/ دراستن)پس‌از رنگ آمیزی‌صفحه، درحرارت ۵۰درجه‌بمدت ۱۰ دقیقه گذاشته‌میشود.

Pauly's reagent : الف – اسید سولفانیلیك ۰/۹ دراسید کلرئیدریك یك نرمال .

ب – نیتریت سدیم ۰/۵ .

ج – محلول اشباع شده کربنات سدیم در آب .

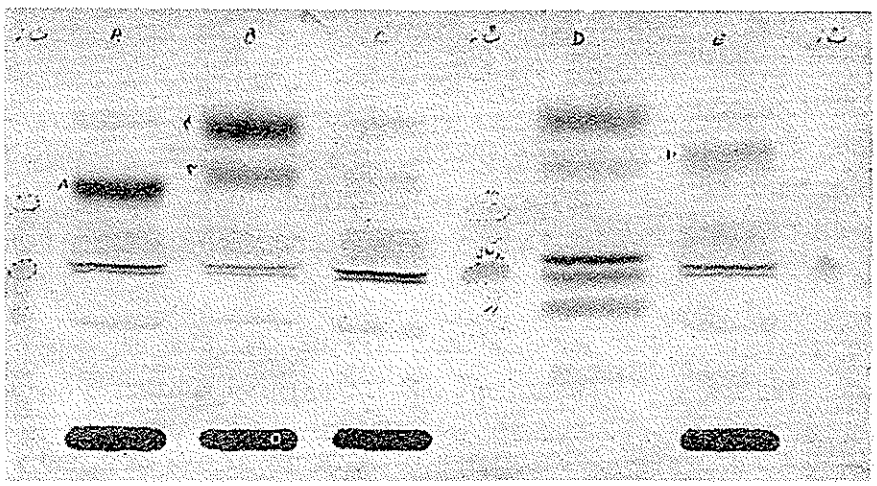
۵ سی‌سی از الف با ۵سی‌سی از ب مخلوط کرده پس‌از۵ دقیقه ۱۵ سی‌سی ازمحلول ج اضافه کرده و روی صفحه کروماتوگرافی پاشیده می‌شود . تمام محلولها باید دریخچال نگاهداری شود .

Erlich reagent: ۵ سی‌سی‌ازمحلول ۰/۱۰ P – dimethylaminobenzaldehyde

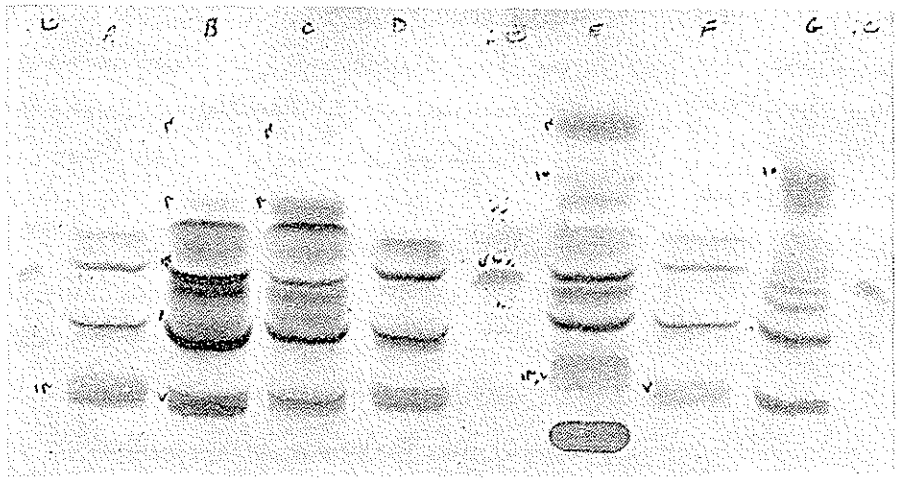
در اسید کلرئیدریك غلیظ را با ۲۰ سی‌سی استن رقیق نموده وصفحه کروماتوگرافی‌را رنگ نموده وچند دقیقه‌درگرما گذاشته میشود .

Iodo / Platinate reagent: به ۱۰ سی‌سی از محلول ۰/۰۱/ اسیدکلروپلاتینیك دراسیدکلرئیدریك ۰/۲ نرمال ، ۰/۶ سی‌سی محلول یدورپتاسیم (۱۶۷میلیگرم / سی‌سی)اضافه میگردد [۸] درموقعی‌که ازاین محلول رنگ آمیزی استفاده میشود ازکروماتوگرافی 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 مختلف‌استاندارد میتوان‌استفاده نمود.عکس شماره(۱) کروماتوگرافی‌پلاسما وعکس شماره(۲) کروماتوگرافی‌ادرار را



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



عکس شماره ۳ 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. در این آزمایش از استاندارد یك‌هشتم رقیق شده استفاده شده است . در کروماتوگرافی پلاسما در نقطه شروع کروماتوگرافی هاله‌ای تشکیل میشود (عکس شماره ۱) این هاله در نمونه‌های تازه کمتر مشاهده میشود . علت بوجود آمدن آن مشخص نیست [۴] .

چنانچه از عکس‌ها مشاهده می‌شود نشانه، سه رنگ ایجاد میکند . رنگ زرد با والین ــ رنگ پرتقالی با پرولین و رنگ قرمز با گلیسین حرکت میکند .

اسیدهای آمینه که در تابلو مشاهده میشوند محل آن روی عکس با شماره 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 ترئونین	۱۳ ــ هیستیدین
۷ــ سیستین	۱۴ ــ پرولین

بحث

کروماتوگرافی روی لایه نازك سلولز با مقایسه با کروماتوگرافی روی کاغذ بسیار حساس و سریع میباشد. [۹] واحتیاج به جدا کردن پروتئین و نمك نیست واز این نظر نیز در وقت صرفه‌جوئی میشود . برای خواندن کروماتوگرافی ابتدا از رنگ آمیزی نایندرین استفاده می‌شود با این رنگ تمام اسیدهای آمینه غیر از پرولین رنگ بنفش بخود میگیرند . نظر باینکه بعضی اسیدهای آمینه خیلی نزدیك بهم حرکت میکنند برای مشخص نمودن از رنگهای اختصاصی استفاده میشود . در رنگ آمیزی اختصاصی نمونه مورد آزمایش ومحلول اسیدهای آمینه که مشکوك به افزایش می‌باشند توأماً با کنترل کروماتوگرافی میشوند .

ایزاتین برای رنگ آمیزی پرولین بکار می‌رود . این اسید آمینه با نایندرین رنگ پرتقالی خیلی کم‌رنگ و با ایزاتین رنگ آبی بخود میگیرد . محلول O ــ Phthalaldehyde برای مشخص نمودن هیستیدین و گلیسین و Pauly برای رنگ آمیزی هیستیدین و ارلیخ برای رنگ آمیزی تریپتوفان استفاده میشود رنگ یدوکلرو پلاتینیك برای رنگ آمیزی سیستین ، سیستئین و متیونین بکار می‌رود و چون پلاتین روی آلومینیوم اثر کرده و پلاتین سیاه بوجود آورده و آب اکسیژنه آزاد می‌کند باین جهت برای استفاده از این رنگ آمیزی کروماتوگرافی روی سلولز آماده شده روی پلاستیك و یا شیشه انجام می‌گردد . لوسین و ایزولوسین خیلی نزدیك بهم حرکت میکنند برای مشخص نمودن این اسیدهای آمینه مثلا در بیماری Maple syrup urine disease [۲] از کروماتوگرافی با حلال C ــ amylalcohol ، متیل اتیل کتون و آب [۶۰ــ۲۰ــ۲۰] استفاده میشود . این حلال خیلی آهسته حرکت می‌کند و ۹۰ دقیقه برای هر بار کروماتوگرافی لازم است . با این روش لوسین، ایزولوسین و والین بخوبی از هم جدا میشوند .

آزمایش هم‌زمان اسیدهای آمینه پلاسما و ادرار در روی یك صفحه نازك کروماتوگرافی لازم است مخصوصاً برای تشخیص بین آمینواسیداوریهای ضایعه کلیوی از آمینواسید در بیماری که در اثر افزایش اسیدهای آمینه پلاسما میباشد [۳] . در سه ماه اول زندگی افزایش آمینواسیدوری بعلت تکامل نیافتن مکانیسم جذب لوله‌ای کلیه وجود دارد [۳] این حالت در کودکان نارس طولانی‌تر است [۱۰] باین جهت در این سن برای کنترول از کودکان هم‌سن باید استفاده نمود و چند ماه بعد نیز کروماتوگرافی را تکرار کرد .

باید توجه داشت که بیشتر آمینواسیدوریها موقتی میباشند. در یك تجربه از ۳۱۶ آمینواسیدوری فقط ۶ نفر از آنها دائمی

بوده‌اند [۱۱] ازطرف دیگرافزایش بعضی از اسیدهای‌آمینه که همراه با عقب افتادگی روانی است در دوران کودکی بخوبی دیده میشودولی درسالهای بعدافزایش اسیدآمینه‌ثابت‌نیست[۱۲] باین جهت‌آزمایش‌اسیدهای‌آمینه‌دراوایل 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 راشی‌تیسم‌تغذیه‌ای‌آمینواسیدوری‌منتشردیده 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 .

مشخص‌نمودن‌اسیدهای‌آمینه‌پلاسماوادراردربیماران‌مبتلا به اختلالات متابولیسم‌کمك مهمی به‌تشخیص‌کلینیکی مینماید .

آزمایش‌روی‌لایه‌سلولز آماده‌شده روی‌آلومینیوم 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.I. & 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 .