دکتر هایده مالک*
دکتر محمدمهدی افلاطونی **

کروماتوگرافی آمیدهای آمینه ادرار روی ورقه‌ای از منس‌ژل سیلیس

روش Stall - Dünnschicht

اساس این روش برتفکیک دوجهته بوسیله کرماتوگرافی کوتاه‌مدت میباشد ـ که این تفکیک دوجهته‌آمیدهای آمینه ادرار سبب تشخیص کیفی وارزیابی کمی آنها میگردد.

وسایل ـ ۱ـ یکعدد گاباری برای گسترش .

۲ـ دوصفحه شیشه ۲۰در۲۰ .

۳ـ دوصفحه ترمینال ۵در۲۰ .

٤ـ یک شوآله برای نمونه گذاری‌نمونه‌ها واندازه‌گیری Rapport au fond R.F. de solvant .

۵ـ دوپیپت دمیکرولیتری .

٦ـ یک قفسه طبقه‌دار .

۷ـ یک دسیکاتور بزرگ .

۸ـ دستگاه گسترش دهنده شکاف دارقابل تنظیم برای گسترش ژل سی لیس (Etaleur de Stahl)

۹ـ دومخزن مستطیل‌شکل باسرپوش‌های سمباده‌ای .

۱۰ـ یک پودرپاش که به‌یک پوارکائوچوکی یایک کمپرسور وصل است.

۱۱ـ یک خشک‌کننده مانند خشک‌کنندهٔ مو .

۱۲ـ یک آژیتاتورمانند آژیتاتورهای سرولوژیک یا شبیه‌به آژیتاتورهائی که در آزمایشهای هورمونی بکارمیبرند.

معرف‌ها ـ ژل‌سی‌لیس کارخانه مرک .

---

* رئیس بخش آزمایشگاه بیمارستان رازی
** استادیار بخش آزمایشگاه بیمارستان رازی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-28]

تامپون فسفات که PH آن ۷ وبفرمول زیرمیباشد:

محلول A : فسفات دی‌سودیک همراه با ۱۲ مولکول ۷۱/۶ گرام
آب‌مقطر مقدار کافی تا ۱۰۰۰ »

محلول B : فسفات مونوپتاسیک ۲۷ »
آب‌مقطر مقدار کافی تا ۱۰۰۰ »

این دومحلول‌را بمقدار مساوی درموقع استعمال‌مخلوط نموده وبکارمیبرند.

— آناتول مطلق .

— آمونیاك خالص مرك .

— نین هیدرین .

— بوتانول .

— آمبرلیت I.R.C ۱۲۰ (۲۰ تا ۵۰ متر) H^+ (یک نوع رزین است که بنام آمبولیت کاتیونیک نامیده میشود) .

— آسید کلرهیدریک غلیظ ومحلول آسید کلرهیدریک نرمال .

— دی‌متیل آمینوبنزآلدهید .

— سولفانیل آمیدیا F ۱۱۶۲ که یکنوع سولفامیدمیباشد.

— نیتریت دوسدیم .

— کاربنات دوسدیم .

— معرف نین هیدرین که عبارتست‌از :

نین هیدرین ۰/۲ گرم .

بوتانول اشباع شده‌ازآب ۱۰۰cc (ازبوتانول این استفاده میشود که‌به‌آن کم کم آب افزوده باشند این افزایش‌آب را بایدباحرکت دادن توأم نمود آنقدرآب باید افزود که دوطبقه بوجود بیاید.طبقه فوقانی بوتانول وطبقه زیرین‌آب است که باید بوتانول‌را ازآب‌جدا وازآن استفاده نمود.

وقتی که مخلوط درضمن حرکت کدر شد میگذارند مدت یک شب‌درحرارت‌آزمایشگاه بماند تادکانته شده وبعد قسمت فوقانی‌را جمع‌آوری میکنند - ازاین معرف برای رنگ‌آمیزی استفاده میشود بدین طریق که آنرا برروی صفحه خشك پولوریزه کرده و سپس درحرارت ۱۰۰ درجه بمدت ده دقیقه خشك مینمایند.

— معرف ارلیش

دی‌متیل - آمینوبنزآلدئید ۱ گرم .

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-28]

آسید کلرهیدریک غلیظ ۰. cc

الکل ۹۶ درجه ۰. cc

برای رنگ‌آمیزی این معرف‌را روی صفحه خشک پولوریزه کرده بعد درحرارت ۱۰۰ درجه‌بمدت ده دقیقه خشک‌مینمایند .

— معرف پولی

محلول A : سولفانیل آمید . ۱ گرم

آسید کلرهیدریک نرمال مقدارکافی تا ۱۰۰۰ cc

محلول B : نیتریت دوسدیم ۱/۲۵ گرم .

آب‌مقطر مقدارکافی تا ۲۵ cc

درموقع کاراین دومحلول رابه نسبت پائین مخلوط ومحلول هائی ازآن بفرمول زیرتهیه مینمایند:

محلول A ۲/۵ cc

محلول B ۲/۵ cc

بوتانول مقدارکافی تا ۲۵ cc

این محلول‌را فوراً مخلوط نموده وقسمت فوقانی‌راکه مورد مصرف است‌جدا مینمایند.

— محلول کاربنات دوسدیم نیمه اشباع

کاربنات دوسدیم ۱۰/۲۷ گرام

آب‌مقطر مقدارکافی تا ۱۰۰ cc

این محلول برای آشکارکردن رنگ آمیزی بکارمیرود بدین ترتیب که ابتدا معرف روی صفحه‌ای که‌به کمک‌هوای گرم خشک شده پولوریزه‌میشود وبعدمحلول کربنات‌دوسدیم را پولوریزه نموده وخشک مینمایند.

محلول اتالون ـ که عبارت ازمحلول ۲/. درصدآسیدهای‌آمینه ادرار در $\frac{1}{10}$ ClH نرمال میباشد.

روش ـ

الف ـ ازبین بردن مواد معدنی ادرار ـ این کار روی آمبرلیت I.R.C. ۱۲۰ انجام میشود. پس‌ازاینکه مدت یکشب ادرار ۲٤ ساعته را باچند cc کلرفرم ودرحرارت ٤ درجه نگهداری نمودیم ۲۰ cc ادرار را بوسیله حرکت هموژنه نموده صاف کرده و برای ثبت آمیدهای آمینه به‌آن رزین کاتیونیک میافزائیم .

ادرار صاف شده ۲۰ cc

آمبرلیت ۱۲۰ cc (آمبرلیت کاتیونیک ۱۰ گرم)

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-28]

این مخلوط را مدت یکساعت بهم زده مایع روادکانته نموده وسپس رزین رابه دفعات مکرر باآب مقطر میشوئیم تامایع شفافی بدست بیاید ـ آسیدهای آمینه را با افزایش ۱۰cc آمونیاك غلیظ و ۳۰ـ ٤ دقیقه تکان دادن از رزین جدا مینمائیم ـ آمونیاك وآب های شستشو راکه به دفعات مکرر بدست آمده اند دریك کپسول جمع کرده وبه کمك یك منبع هوای گرم تبخیرمینمائیم باقی مانده را در ۱cc آب مقطر حل مینمائیم این محلول ۲ برابرغلیظ ترازادرار اصلی میباشد. مقدار نمونه گذاری بااین محلول معادل ۵ میکرولیتر خواهد شد:

$$\text{میکرولیتر } ۵ = \frac{۱/۰ \text{ میلی‌لیتر (مقدار ادرار نمونه گذاری)}}{۲۰ \text{ (نسبت غلظت محلول به ادرار)}}$$

برحسب اینکه مقدار آسیدآمینه ادرار کمتر یا زیادتر بنظررسد مقدار نمونه گذاری بین $\frac{۱}{۵۰۰۰}$ تا $\frac{۱}{۱۵۰۰۰}$ حجم ادرار ٤ ۲ساعت را نیزپیدا نمائید.

ب ـ آماده نمودن وسائل وتهیه مقدمات .

۱ـ **اشباع مخزن** ـ مخزن اول برای جهت اول Première dimension آمونیاك خالص درگ یاحجم(۲۰cc) .

الکل ۹۶ ٤ حجم یا (۸۰cc)

در دومین جهت برای مخزن دوم .

الکل ۷۰ ۱۰۰cc

یکساعت قبل از شروع کروماتوگرافی محلول آمونیاك والکل را درمخزن ریخته سپس کروماتوگرافی را دراولین جهت انجام میدهند. یکساعت قبل از کروماتوگرافی درجهت دوم الکل را درمخزن ریخته وبعد کرماتوگرافی را درجهت دوم انجام میدهند ـ اگرسطح داخلی مخازن را باکاغذ صافی بپوشانند عمل اشباع مخزن بهترصورت خواهد گرفت .

۲ـ **طرز تهیه صفحات سیلیس G** : که بدین ترتیب انجام میشود.

ژل سیلیس ۳۰ گرام

تامپون فسفات ۷۰cc

دریك هاون بخوبی به هم زده وسپس برروی شیشه هائی که برروی گسترش دهنده ستال قرار دارند جریان میدهیم این عمل باید حداکثر درمدت ٤ دقیقه و قبل از بسته شدن ژل انجام بگیرد. پس از گسترش صفحات را درهوای آزادخشك ودر دسیکاتورنگهداری نمائیم

۳ـ **نمونه گذاری برروی صفحات** ـ ابتدا یك نقطه درپائین وسمت چپ بفاصله ۳ سانتیمتر ازدو کناره شیشه برروی صفحه میگذاریم ـ این نقطه بعنوان پوآن دورپرخواهدبود .

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-28]

سپس معادل $\frac{1}{10000}$ حجم ادرار ٤ ۲ساعت یاتقریباً $\frac{1}{10}$ میلی‌لیتر ادرار ازمحلول تهیه شده قبلی (٥میکرولیتر) برروی نمونه گذاری برداشت مینمائیم وبرروی نقطه‌ایکه قبلاً در روی شیشه مشخص شده است میگذاریم وبعد به کمک هوای گرم آنرا خشک میکنیم .

٤- **کروماتوگرافی** - صفحه آماده شده‌را در داخل مخزن کروماتوگرافی مستقیم قرارداده بطوریکه حلال تایکسانتی‌متری کنار تحتانی مخزن برسد سپس بمدت دوساعت و ٤ ۱ درجه حرارت برای مخزن آمونیاك و٤ساعت برای مخزن الکل میگذاریم بماند مابین دوعمل مهاجرت صفحات‌را باید درحالت ۸۰تا ۱۰۰ درجه دراتوخشك‌نموده‌وقبل ازگذاردن درمخزن دوم میگذاریم شمرده شود . درمخزن دوم جهت کرماتوگرافی‌عمودبرجهت کرماتو- اولیه خواهدبود .

٥- **رنگ‌آمیزی** - به کمك یك پودرپاش که به یك کمپرسور وصل شده بطور یکنواخت معرف انتخاب شده را روی صفحه خشك می‌پاشیم وبلافاصله آنرادراتو. ۱۰تا ۸۰ درجه بمدت ۱۰دقیقه میگذاریم برای رنگ‌آمیزی معرفهای متعددی بکار میبرند که‌عبارتند ازمعرف‌نین هیدرین که‌این‌معرف‌آسیدهای‌آمینه وبعضی‌از مشتقات‌دیگررابرنگ‌بنفش درمیآورد .

— معرف ارلیش که تریپتوفان‌را درحرارت عادی به‌رنگ قرمز ودرحرارت ۱۰۰ درجه بمدت ٥دقیقه برنگ سبز تیره درمیآورد . اوره بااین معرف برنگ زرد لیموئی درمیآید ومقدار آن نیزنسبت به‌سایرین زیادتر میباشد - سایر اسیدهای آمینه برنگ زرد کاهی درمیآیند .

— معرف پلی - آسیدهای آمینهٔ راکه دارای هسته‌فنولی هستندبرنگ‌سرخ کمرنگ وسپس قرمز درمیآورد آسیدهای‌آمینه‌ایکه‌دارای هسته ایمیدآزل (Imidazol) یااندل‌هستند وسپس برنگ زرد رنگ میشوند .

٦- **نگهداری** - به‌کمك یک صفحه کاغذ نازك که برروی‌صفحه شیشه قرارمیدهیم محل لکه‌را برروی کاغذ به‌کمك یک مداد نازك مخفی نموده وبرحسب شدت‌رنگ لکه‌ای راکه برروی صفحه کاغذ مخفی شده‌هاشور میزنیم وآنراکه‌پررنگ تراست باهاشور پررنگ و کمرنگ‌تر را باهاشورکمرنگ مخفی میکنیم .

۷- **اتالوناژ** - ازمخلوطی ازآسیدهای آمینه‌خالص ادرار یک‌کروماتوگرافی دوطرفه انجام داده وبدین ترتیب یک‌کارت شاهد مخفی تهیه مینمائیم وسپس ادرار مورد آزمایش را با کارت تهیه شده مقایسه نموده و نوع ومقدار آسید های آمینه آنرا تعیین مینمائیم درصورتیکه درادراری به‌آسیدآمینه‌ایکه دراتالون وجود ندارد مشکوك باشیم باید دراتالون ازآن نوع اسید آمینه‌ریخته وکارت کروماتوگرافی آنرا تهیه نمائیم تابرای‌مقایسه باکرماتو- گرافی انجام شده برروی ادرار ازآن استفاده‌شود .

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-28]

۸- محاسبه R.F (سرعت مهاجرت) :

برای اندازه گیری R.F فاصله بین لکه‌ها ازنقطه حرکت برفاصله آخرین نقطه‌ایکه حلال حرکت نموده است تقسیم میکنیم .

$$R.F = \frac{\text{فاصله بین لکه ازنقطه حرکت}}{\text{فاصله بین آخرین محل حلال ازنقطه حرکت}}$$

از روی R.F میتوان انواع آسیدآمینه را بخوبی مجزا نموده و از هم تشخیص داد البته باید حرارت ثابت بوده زیرا تغییرحرارت سبب تغییر R.F میشود .

تفسیر کروماتوگرافی یك ادرارطبیعی

در ادرارطبیعی ۸تا۹ لکه‌که به‌ترتیب دیده میشود .

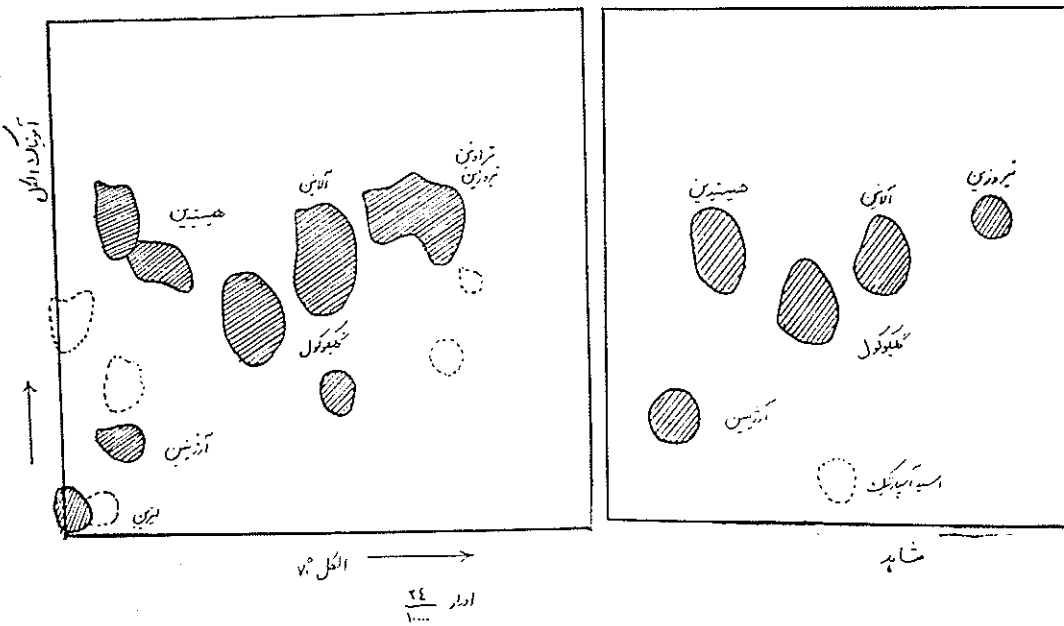
۱- گلی کوکل ۲- هیستیدین ۳- لیزین

٤- یك گروه سه‌تائی آسید آمینه‌که دارای یك نوع R.F در دو جهت میایستد مانند تریپتوفان - تیروزین - فنیل آلانین . ٥- آسید گلوتامیک ٦- آسید آسپارتیك .

۷- آلانین ۸- سیستئین که درجهت دوم زیاد جابجا نمیشود ۹- آرژینین

وبعلاوه از۱تا٤ لکه اضافی خیلی کمرنگ نیزدیده میشودکه هویت‌آنها مشخص نشده‌است.

تصویر زیریک نمونه کروماتوگرافی در دوجهت ادررا نشان میدهد.



1- Technique Moderne laboratoire 1961-1959

2- « « « 1962

3- Springer - verlag. Belin 1962: E stahl Dünnchicht 1962

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-28]