

گروهاتو گرافی آسیدهای آهینه ادرار روی ورقه‌ای از منس ژل سیلیس

روش Stall - Dünnschicht

اساس این روش بر تفکیکیک دوجهته بوسیله کرماتو گرافی کوتاه‌مدت میباشد - که این تفکیکیک دوجهته آسیدهای آهینه ادرار سبب تشخیص کینی و ارزیابی کمی آنها میگردد .
وسائل - ۱- یک عدد گاباری برای گسترش .

۲- ده صفحه شیشه ۰ ۲۰ در .

۳- دو صفحه ترمیتال ۵ در .

۴- یک شواله برای نمونه گذاری نمونه‌ها و اندازه گیری

. de solvant

۵- دوبیت دهیکرولیتری .

۶- یک قفسه طبقه‌دار .

۷- یک دیلکانور بزرگ .

۸- دستگاه گسترش دهنده شکاف دار قابل تنظیم برای گسترش ژل می‌لیس

(Etaleur de Stahl)

۹- دومخزن مستطیل شکل با سریوش‌های سعباده‌ای .

۱۰- یک پودریاش که بدیک پوار کائوچو کی یا یک کمپرسور وصل است .

۱۱- یک خشک کننده مانند خشک کننده مو .

۱۲- یک آریتاورسانند آریتاورهای سرولوز یک یا شبیه به آریتاورهایی که در

آزمایش‌های هورمونی بکار میبرند .

معروف‌ها - ژل می‌لیس کارخانه مرگ .

* رئیس بخش آزمایشگاه بیمارستان رازی

** استادیار بخش آزمایشگاه بیمارستان رازی

تابپون فسفات که PH آن ۷ و بفرمول زیر میباشد:

۷۱/۶ گرام

محلول A: فسفات دی سودیک همراه با ۲۱ مولکول آب مقطور مقدار کافی تا

۱۰۰

محلول B: فسفات مونو پتاسیک

۲۷

آب مقطور مقدار کافی تا

۱۰۰

این دو محلول را به مقدار مساوی در موقع استعمال مخلوط نموده و بکار میبرند.

— آناتول مطلق.

— آمونیاک خالص مرک.

— نین هیدرین.

— بوتانول.

— آمبریلت I.R.C ۱۲۰ (۰.۲ تا. متر) H^+ (یک نوع رزین است که بنام

آمبولیت کاتیونیک نامیده میشود).

— آسید کلر هیدریک غلیظ و محلول آسید کلر هیدریک نرمال.

— دی متیل آمینو بنزآلدھید.

— سولفانیل آمیدیا F ۱۱۶۲ که یک نوع سولفامید میباشد.

— نیتریت دومدیم.

— کاربنات دوسدیم.

— معرف نین هیدرین که عبارتست از:

نین هیدرین ۲/۰ گرم.

بوتانول اشبع شده از آب ۰۰۱ (از بوتانول این استفاده میشود که به آن کم کم

آب افزوده باشند این افزایش آب را باید باحرکت دادن توأم نمود آنقدر آب باید افزود که دو طبقه بوجود بیاید. طبقه فوقانی بوتانول و طبقه زیرین آب است که باید بوتانول را از آب جدا و از آن استفاده نمود.

وقتی که مخلوط در ضمن حرکت کدر شد میگذارند بدست یک شب در حرارت آزمایشگاه بماند تا در کانته شده و بعد قسمت فوقانی را جمع آوری میکنند. از این معرف برای رنگ آمیزی استفاده میشود بدین طریق که آنرا بر روی صفحه خشک پولوریزه کرده و سپس در حرارت ۱۰۰ درجه بمدت ده دقیقه خشک مینمایند.

— معرف ارلیش

دی متیل آمینو بنس آلدھید

۱ گرم.

آسید کاربیدریک غلیظ
الکل ۹۶ درجه
برای رنگ آمیزی این معرف را روی صفحه خشک پولوریزه کرده بعد در حرارت ۱۰۰ درجه بعدت ده دقیقه خشک مینمایند.

— معرف پولی —

محلول A : سولفانیل آمید . ۱ گرم

آسید کلریدریک نرمال مقدار کافی تا ۱۰۰۰cc

محلول B : نیتریت دوسدیم ۰/۱۵ گرم

آب مقطر مقدار کافی تا ۰/۰۲۰cc

در موقع کار این دو محلول را به نسبت پائین مخلوط و محلول هائی از آن بفرمول زیر تهیه مینمایند :

محلول A ۰/۲cc

محلول B ۰/۲cc

بوتانول مقدار کافی تا ۰/۰۲cc

این محلول را فوراً مخلوط نموده و قسمت فوقانی را که مورد مصرف است جدا مینمایند.

— محلول کاربنات دوسدیم نیمه اشامع —

کاربنات دوسدیم ۰/۰۲۷ ۱ گرام

آب مقطر مقدار کافی تا ۱۰۰cc

این محلول برای آشکار کردن رنگ آمیزی بکار می رود بدین ترتیب که ابتدا معرف روی صفحه ای که به کمک هوای گرم خشک شده پولوریزه می شود و بعد محلول کاربنات دوسدیم را پولوریزه نموده و خشک مینمایند.

محلول اتالون - که عبارت از محلول ۰/۰۰۰cc HCl از آسید های آسینه ادرار در

نرمال می باشد.

روش -

الف - ازین بردن مواد معدنی ادرار - این کار روی آسپریت I.R.C. ۱۲۰ انجام می شود. پس از آن که مدت یک شب ادرار ۴ ساعته را با چند ۰/۰۰۰cc کلرفرم در حرارت ۴ درجه نگه داری نمودیم ۰/۰۰۰cc ادرار را بوسیله حرکت هموزن نموده صاف کرده و برای ثبت آسید های آسینه بدآن رزین کاتیونیک می افزاییم.

ادرار صاف شده ۰/۰۰۰cc

آسپریت کاتیونیک ۰/۰۰۰cc (۱ گرم)

این مخلوط را بدت یکساعت بهم زده مایع روراد کائنه نموده و سپس رزین رابه دفعات مکرر با آب مقطر میشوئیم تا مایع شفافی بdest بیاید - آسیدهای آمینه را با افزایش $CC_{1,0}$ آمونیاک غلیظ و .۳ .۴ دقته تکان دادن از رزین جدا مینماییم - آمونیاک و آب های سیستشو را که به دفعات مکرر بدست آمده اند در یک کپسول جمع کرده و به کمک یک منبع هوای گرم تبخیر مینماییم باقی مانده را در CC_1 ، آب مقطر حل مینماییم این محلول .۲ برابر غلیظ تراز ادرار اصلی میباشد. مقدار نمونه گذاری با این محلول معادل 0.5 ml میکرو لیتر خواهد شد:

$$\text{میکرو لیتر} = \frac{1}{1000} \cdot \text{میلی لیتر} (\text{مقدار ادرار نمونه گذاری})$$

$$2. \quad (\text{نسبت غلظت محلول به ادرار})$$

بر حسب اینکه مقدار آسید آمینه ادرار کمتر یا زیادتر بنتروزد مقدار نمونه گذاری بین

$\frac{1}{5000}$ تا $\frac{1}{1000}$ حجم ادرار ۲ ساعت را نیز پیدا نماید.

ب - آماده نمودن وسائل و تجهیز مقدمات .

۱- اشباع مخزن - مخزن اول برای جهت اول Première dimension آمونیاک خالص مرگ یا حجم (۲۰ cc) .

۹۶ الکل ۸۰ حجم یا (cc)

در دوین جهت برای مخزن دوم .

۱۰۰ cc ۷۰ الکل

یکساعت قبل از شروع کروماتوگرافی محلول آمونیاک والکل را در مخزن ریخته سپس کروماتوگرافی را در اولین جهت انجام میدهد. یکساعت قبل از کروماتوگرافی درجهت دوم الکل را در مخزن ریخته و بعد کروماتوگرافی را درجهت دوم انجام میدهد - اگر سطح داخلی مخازن را با کاغذ صافی پوشانند عمل اشباع مخزن بهتر صورت خواهد گرفت .

۲- طرز تهیه صفحات سیلیسیس G : که بدین ترتیب انجام میشود.

۳. گرام

CCV.

ژل سیلیس

تامپون فسفات

در یک هاون بخوبی به هم زده و میس بروی شیشه هائی که بروی گسترش دهنده ستال قرار دارند جریان میدهیم این عمل باید حداقل دو دقیقه و قبل از بسته شدن ژل انجام بگیرد. پس از گسترش صفحات را در هوای آزاد خشک کنید و در دیکاتور نگهداری نماییم

۳- نمونه گذاری بروی صفحات - ابتدا یک نقطه در پائین و سمت چپ بفاصله ۳ مانتیمتر از دو کناره شیشه بروی صفحه میگذاریم - این نقطه بعنوان پوآند دور بخواهد بود.

سپس معادل ۱۰۰۰۰ حجم ادرار ۴ ساعت یا تقریباً ۱ میلی لیتر ادرار از محلول تهیه شده قبلی (۵ میکرولیتر) برروی نمونه گذاری برداشت مینماییم و برروی نقطه ایکه قبال در روی شیشه شخص شده است میگذاریم و بعد به کمک هوای گرم آرا خشک میکنیم.

۴- کروماتوگرافی - صفحه آماده شده را در داخل مخزن کروماتوگرافی مستقیم قرارداده بطوريکه حلال تایکسانتی متري کنار تختانی مخزن برسد سپس بعده دو ساعت و ۴ درجه حرارت برای مخزن آسونیاک ۴ ساعت برای مخزن الكل میگذاریم بعائد داین دو عمل سهاجرت صفحات را باید درحال تا ۸۰ درجه در اتوخشک کنموده و قبل از گذاردن در مخزن دوم میگذاریم شمرده شود. در مخزن دوم جهت کرماتوگرافی عمود برجهت کرماتو اولیه خواهد بود.

۵- رنگ آمیزی - به کمک یک پورپاش که به یک کمپرسور وصل شده بطور یکنواخت معرف انتخاب شده را روی صفحه خشک می پاشیم و بلا فاصله آنرا در راتو ۱۱ تا ۸۰ درجه بعده . ۱ دقیقه میگذاریم برای رنگ آمیزی معرفهای متعددی بکار میبرند که عبارتند از معرف نین هیدرین که این معرف آسیدهای آسینه و بعضی از مشتقات دیگر ابرنگ بنشش در میآورد. — معرف ارلیش که تریپتوفان را در حرارت عادی به رنگ قرمز و در حرارت ۱۱ درجه بعده ۵ دقیقه بررنگ سبز تیره در میآورد. اوره با این معرف بررنگ زرد لیموئی در میآید و مقدار آن نیز نسبت به سایرین زیادتر میباشد . سایر آسیدهای آسینه بررنگ زرد کاهی در میآیند .

— معرف پلی - آسیدهای آمینه را که دارای هسته فنولی هستند بررنگ سرخ کمرنگ و سپس قرمز در میآورد آسیدهای آسینه ایکه دارای هسته ایمیدآل (Imidazol) یا اندل هستند و سپس بررنگ زرد رنگ میشوند.

۶- نگهداری - به کمک یک صفحه کاغذ نازک که برروی صفحه شیشه قرار میباشد محل لکه را برروی کاغذ به کمک یک مداد نازک مخفی نموده و بر حسب شدت رنگ لکه ای را که برروی صفحه کاغذ مخفی شده باشود میزنیم و آنرا که پررنگ تراست باهاشور پررنگ و کمرنگ تر را باهاشور کمرنگ مخفی میکنیم .

۷- اتالو ناز - از محلولی از آسیدهای آمینه خالص ادرار یک کرماتوگرافی دوطرفه انجام داده و بدین ترتیب یک کارت شاهد مخفی تهیه مینماییم و سپس ادرار مورد آزمایش را با کارت تهیه شده مقایسه نموده و نوع و مقدار آسیدهای آمینه آنرا تعیین مینماییم درصورتیکه درادراری به آسید آمینه ایکه در اتالو وجود ندارد مشکوک باشیم باید در اتالو از آن نوع آسید آمینه ریخته و کارت کرماتوگرافی آنرا تهیه نمائیم تا برای مقایسه با کرماتوگرافی انجام شده برروی ادرار از آن استفاده شود.

۸- محاسبه R.F (سرعت مهاجرت):

برای اندازه گیری R.F فاصله بین لکه ها از نقطه حرکت برفاصله آخرین نقطه ایکده حلال حرکت نموده است تقسیم میکنیم.

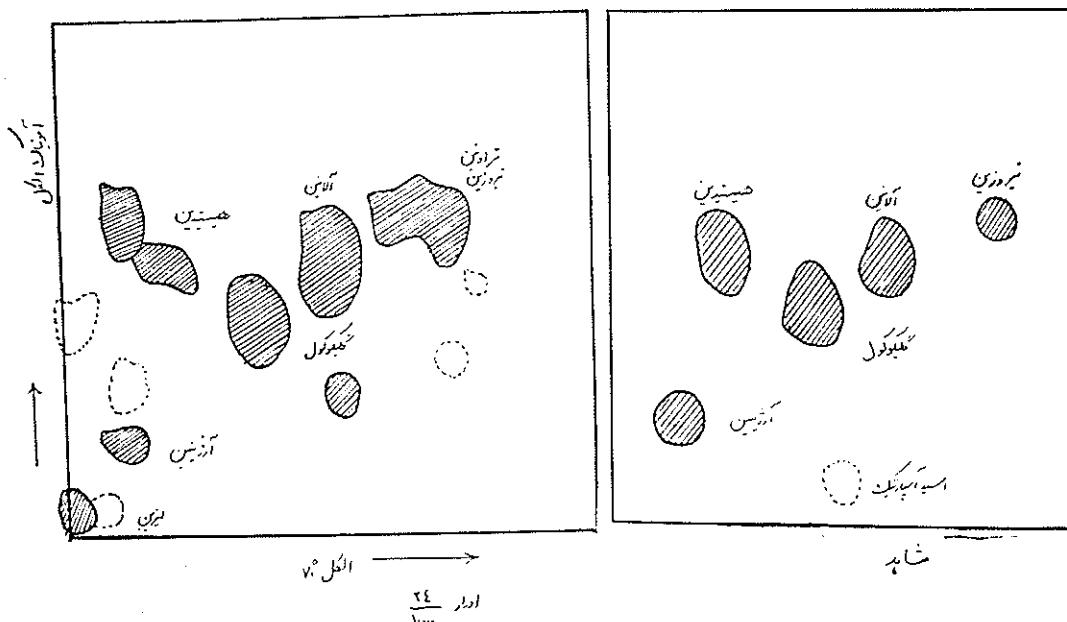
$$R.F = \frac{\text{فاصله بین لکه از نقطه حرکت}}{\text{فاصله بین آخرین محل حلال از نقطه حرکت}}$$

از روی R.F میتوان انواع آسید آسینه را بخوبی معجزا نموده و از هم تشخیص داد البته باید حرارت ثابت بود زیرا تغییر حرارت سبب تغییر R.F میشود.

تفسیر کروماتوگرافی یک ادرار طبیعی در ادرار طبیعی تا و لکه که به ترتیب دیده میشود.

۱- گلی کوکل ۲- هیستیدین ۳- لیزین

۴- یک گروه سه تائی آسید آسینه که دارای یک نوع R.F در دو جهت میباشد مانند تریپتوفان - تیروزین - فنیل آلانین . ۵- آسید گلوتامیک ۶- آسید آمپارتیک ، ۷- آلانین ۸- سیستین که درجهت دوم زیاد جایجا نمیشود ۹- آرژینین و بعلاوه از تاue لکه اضافی خیلی کمرنگ نیز دیده میشود که هویت آنها مشخص نشده است. تصویر زیریک نمونه کروماتوگرافی در دو جهت ادرار را نشان میدهد.



۱- Technique Moderne laboratoire 1961-1959

۲- " " " 1962

۳- Springer - verlag, Berlin 1962: E stahl Dünnschicht 1962