

گرماتوگرافی آمیدهای آمینه ادرار روی ورقه‌ای از منس ژل سیلیس

روش Stall - Dünnschicht

اساس این روش بر تفکیک دو جهت بوسیله گرماتوگرافی کوتاه مدت میباشد - که این تفکیک دو جهت آمیدهای آمینه ادرار سبب تشخیص کیفی و ارزیابی کمی آنها میگردد .

وسایل - ۱- یک عدد گاباری برای گسترش .

۲- ده صفحه شیشه ۲۰ در ۲۰ .

۳- دو صفحه ترمینال ۵ در ۲۰ .

۴- یک شواله برای نمونه گذاری نمونه ها و اندازه گیری R.F. Rapport au fond

de solvant .

۵- دو بیت ده میکرو لیتری .

۶- یک قفسه طبقه دار .

۷- یک دسیکاتور بزرگ .

۸- دستگاه گسترش دهنده شکاف دار قابل تنظیم برای گسترش ژل سی لیس

(Etaleur de Stahl)

۹- دو مخزن مستطیل شکل با سرپوش های سمباده ای .

۱۰- یک پودر پاش که بد یک پوار کائوچو کی یا یک کمپرسور وصل است .

۱۱- یک خشک کننده مانند خشک کننده سو .

۱۲- یک آژیتاتور مانند آژیتاتورهای سرو لوژیک یا شبیه به آژیتاتورهایی که در

آزمایشهای هورمونی بکار میبرند .

معرفی ها - ژل سی لیس کارخانه مرگ .

تاسپون فسفات که PH آن ۷ و بفرمول زیر میباشد:

محلول A: فسفات دی‌سودیک همراه با ۱۲ مولکول

آب مقطر مقدار کافی تا

۷۱/۶ گرم

۱۰۰۰

۲۷

۱۰۰۰

محلول B: فسفات مونوپتاسیک

آب مقطر مقدار کافی تا

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

— آناتول مطلق .

— آمونیاک خالص مرک .

— نین هیدرین .

— بوتانول .

— آمبرلیت ۱۲ I.R.C. (۲ تا ۵ متر) H^+ (یک نوع رزین است که بنام

آمبولیت کاتیونیک نامیده میشود) .

— اسید کلریدریک غلیظ و محلول اسید کلریدریک نرمال .

— دی‌متیل آمینوبنزالدهید .

— سولفانیل آمید یا F^{1-} که یکنوع سولفامید میباشد .

— نیتريت دوسدیم .

— کاربنات دوسدیم .

— معرف نین هیدرین که عبارتست از:

نین هیدرین ۱/۲ گرم .

بوتانول اشباع شده از آب . . cc (از بوتانول این استفاده میشود که به آن کم کم

آب افزوده باشند این افزایش آب را باید با حرکت دادن توأم نمود آنقدر آب باید افزود که

دوطبقه 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 سیگدارند مدت یک شب در حرارت آزمایشگاه

بماند تا دکانته 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

۱ گرم

دی‌متیل - آمینوبنزالدهید

آسید کارهیدریک غلیظ CC ۵۰

الکل ۹۶ درجه CC ۵۰

برای رنگ آمیزی این معرف را روی صفحه خشک پولوریزه کرده بعد در حرارت ۱۰۰ درجه بمدت ده دقیقه خشک مینمایند .

— معرف پوئی

محلول A : سولفانیل آسید . ۱ گرم

آسید کلر هیدریک نرمال مقدار کافی تا ۱۰۰ CC

محلول B : نیتريت دوسديم ۱/۲۵ گرم .

آب مقطر مقدار کافی تا CC ۲۵

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

محلول A CC ۲/۵

محلول B CC ۲/۵

بوتانول مقدار کافی تا CC ۲۵

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

— محلول کاربنات دوسديم نيمه اشباع

کاربنات دوسديم ۱۰/۲۷ گرم

آب مقطر مقدار کافی تا CC ۱۰۰

این محلول برای آشکار کردن رنگ آمیزی بکار میرود بدین ترتیب که ابتدا معرف

روی صفحه ای که به کمک هوای گرم خشک شده پولوریزه میشود و بعد محلول کربنات دوسديم را پولوریزه نموده و خشک مینمایند .

محلول اتالون - که عبارت از محلول ۲/۰ درصد آسیدهای آسینه ادرار در CH_2OH -

نرمال میباشد .

— روش -

الف - ازین بردن مواد سعدنی ادرار - این کار روی آسبرلیت ۱۲۰ I. R. C. انجام

میشود . پس از اینکه مدت یک شب ادرار ۲۴ ساعته را با چند CC کلرفرم و در حرارت ۴۰ درجه

نگهداری نمودیم . CC ۲۰ ادرار را بوسیله حرکت هموزنه نموده صاف کرده و برای ثبت آسیدهای آسینه به آن رزین کاتیونیک میافزائیم .

ادرار صاف شده CC ۲۰

آسبرلیت . CC ۱۲ (آسبرلیت کاتیونیک ۱۰ گرم)

این مخلوط را مدت یکساعت بهم زده مایع ورود کالته نموده سپس رزین رابه دفعات مکرر با آب مقطر میشوئیم تا مایع شفافی بدست بیاید - آسیدهای آمینه را با افزایش CC_{10} آمونیاك غلیظ و. ۳- ۴ دقیقه تکان دادن از رزین جدا مینمائیم - آمونیاك و آب های شستشو را که به دفعات مکرر بدست آمده اند دریک کپسول جمع کرده و به کمک یک منبع هوای گرم تبخیر مینمائیم باقی مانده را در CC_{10} آب مقطر حل مینمائیم این محلول ۲ برابر غلیظ تر از ادرار اصلی میباشد. مقدار نمونه گذاری با این محلول معادل ۵ میکرولیتر خواهد شد:

$$\frac{1}{1000} \text{ میلی لیتر (مقدار ادرار نمونه گذاری)} = \frac{1}{2} \text{ (نسبت غلظت محلول به ادرار)} \text{ میکرولیتر } 5$$

برحسب اینکه مقدار آسید آمینه ادرار کمتر یا زیادتر بنظر رسد مقدار نمونه گذاری بین

$$\frac{1}{5000} \text{ تا } \frac{1}{1000} \text{ حجم ادرار } 4 \text{ ساعت را نیز پیدا نمائید.}$$

ب - آماده نمودن وسائل و تهیه مقدمات .

۱- اشباع مخزن - مخزن اول برای جهت اول Première dimension آمونیاك خالص مرگ یا حجم (۲.۵۵) .

الکل ۹۶ ۴ حجم یا (۸۰.۵۵)

در دومین جهت برای مخزن دوم .

الکل ۷۰ ۱۰۰.۵۵

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

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

ژل سیلیس ۳۰ گرم

تامپون فسفات ۷۰.۵۵

دریک هاون بخوبی به هم زده و سپس بر روی شیشه هائی که بر روی گسترش دهنده ستال قرار دارند جریان میدهم این عمل باید حداکثر در مدت ۴ دقیقه و قبل از بسته شدن ژل انجام بگیرد. پس از گسترش صفحات را در هوای آزاد خشک و در دسیکاتور نگهداری نمائیم

۳- نمونه گذاری بر روی صفحات - ابتدا یک نقطه در پائین سمت چپ بفاصله

۳ سانتیمتر از دو کناره شیشه بر روی صفحه میگذاریم - این نقطه بعنوان پوآن دور پر خواهد بود.

سپس معادل $\frac{1}{10000}$ حجم ادرار ۴ ساعت یا تقریباً $\frac{1}{10}$ میلی لیتر ادرار از محلول تهیه شده قبلی (۵ میکرولیتر) بر روی نمونه گذاری برداشت مینمائیم و بر روی نقطه ای که قبلاً در روی شیشه مشخص شده امت میگذاریم و بعد به کمک هوای گرم آنرا خشک میکنیم .

۴- **کروماتوگرافی** - صفحه آماده شده را در داخل مخزن کروماتوگرافی مستقیم قرار داده بطوریکه حلال تا یکسانتی متری کنار تختانی مخزن برسد سپس بمدت دو ساعت و ۱۴ درجه حرارت برای مخزن آسونیاک و ۴ ساعت برای مخزن الکل میگذاریم بماند مابین دو عمل مهاجرت صفحات را باید در حالت ۸۰ تا ۱۰۰ درجه دراتوخشک نموده و قبل از گذاردن در مخزن دوم میگذاریم شمرده شود . در مخزن دوم جهت کروماتوگرافی عمود بر جهت کروماتو- اولیه خواهد بود .

۵- **رنگ آمیزی** - به کمک یک پودر پاش که به یک کمپرسور وصل شده بطور یکنواخت معرف انتخاب شده را روی صفحه خشک می پاشیم و بلافاصله آنرا دراتو . . ۱ تا ۸ درجه بمدت ۱ دقیقه میگذاریم برای رنگ آمیزی معرفهای متعددی بکار میبرند که عبارتند از معرف نین هیدرین که این معرف آسیدهای آمینه و بعضی از مشتقات دیگر را برنگ بنفش در میآورد . — معرف ازلش که تریپتوفان را در حرارت عادی برنگ قرمز و در حرارت . . ۱ درجه بمدت ۵ دقیقه برنگ سبز تیره در میآورد . اوره با این معرف برنگ زرد لیمویی در میآید و مقدار آن نیز نسبت به سایرین زیادتر میباشد - سایر اسیدهای آمینه برنگ زرد گاهی در میآیند . — معرف پلی - آسیدهای آمینه را که دارای هسته فنولی هستند برنگ سرخ کم رنگ و سپس قرمز در میآورد آسیدهای آمینه ای که دارای هسته ایمیدازل (Imidazol) یا اندل هستند و سپس برنگ زرد رنگ میشوند .

۶- **نگهداری** - به کمک یک صفحه کاغذ نازک که بر روی صفحه شیشه قرار میدهم محل لکه را بر روی کاغذ به کمک یک مداد نازک مخفی نموده و در حسب شدت رنگ لکه ای را که بر روی صفحه کاغذ مخفی شده ها شور میزنیم و آنرا که پررنگ تر است با ها شور پررنگ و کم رنگ تر را با ها شور کم رنگ مخفی میکنیم .

۷- **اتالوناز** - از مخلوطی از آسیدهای آمینه خالص ادرار یک کروماتوگرافی دو طرفه انجام داده و بدین ترتیب یک کارت شاهد مخفی تهیه مینمائیم و سپس ادرار مورد آزمایش را با کارت تهیه شده مقایسه نموده و نوع و مقدار آسیدهای آمینه آنرا تعیین مینمائیم در صورتیکه در اداری به آسید آمینه ای که در اتالون وجود ندارد مشکوک باشیم باید در اتالون از آن نوع اسید آمینه ریخته و کارت کروماتوگرافی آنرا تهیه نمائیم تا برای مقایسه با کروماتو- گرافی انجام شده بر روی ادرار از آن استفاده شود .

۸- محاسبه R. F (سرعت مهاجرت) :

برای اندازه گیری R. F فاصله بین لکه ها از نقطه حرکت بر فاصله آخرین نقطه ای که 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 اسید آمینه را بخوبی مجزا نموده و از هم تشخیص داد البته باید حرارت ثابت بوده زیرا تغییر حرارت سبب تغییر R. F میشود.

تفسیر کروماتوگرافی یک ادرار طبیعی

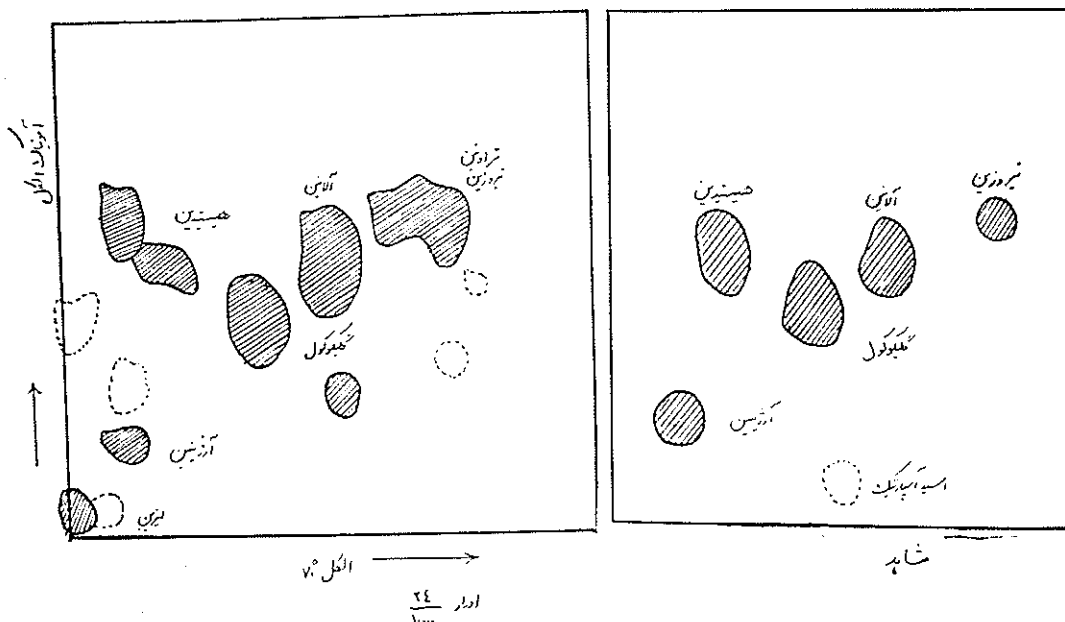
در ادرار طبیعی ۸ تا ۹ لکه که به ترتیب دیده میشود .

۱- گلی کوکل ۲- هیستیدین ۳- لیزین

۴- یک گروه سه تائی اسید آمینه که دارای یک نوع R. F در دو جهت میایستند مانند تریپتوفان - تیروزین - فنیل آلانین . ۵- اسید گلوتامیک ۶- اسید آسپارتیک .

۷- آلانین ۸- سیستئین که در جهت دوم زیاد جا بجا نمیشود ۹- آرژینین
وبعلاوه از ۱ تا ۹ لکه اضافی خیلی کم رنگ نیز دیده میشود که هویت آنها مشخص نشده است .

تصویر زیر یک نمونه کروماتوگرافی در دو جهت ادرار را نشان میدهد .



1- Technique Moderne laboratoire 1961-1959

2- " " " 1962

3- Springer - verlag. Belin 1962; E stahl Dünnschicht 1962