

گروماتوگرافی روی لایه نازک (TLC) برای تشخیص اسیدهای آمینه ادرار و خون

دکتر قدسی دانشمند *

بدون حذف پروتئینها و نمک میتوان به روش گروماتوگرافی روی کاغذ به شرط بکار بردن مقدار خیلی کم از آنها انجام داد و با اینکه گروماتوگرافی روی صفحه حساستر (لایه نازک) انجام گردد [۴]. گروماتوگرافی روی لایه نازک سلولز آماده شده روی صفحه آلومینیم در ۱۹۶۹ توسط Ersser شرح داده شد [۷] که بسیار ساده و سریع و حساس میباشد و به جدا کردن پروتئین و نمک پلاسما و ادرار احتیاجی نیست. این مقاله گزارش آزمایشاتی است که با این روش انجام شده و مناسب بودن آن تأیید شده است. موارد و روش اجرای آزمایش: برای آزمایش از لایه نازک سلولز (۱/۰ میلیمتر ضخامت) تهیه شده روی صفحه آلومینیموم (۵/۹ × 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 گروماتوگرافی گذاشته میشود.

محلول استاندارد مخلوطی است از اسیدهای آمینه ذیل:

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

مقدمه: در بیماریهای اختلال متابولیسم اسیدهای آمینه، افزایش یک 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 به علت 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 یک بیماری ارثی در یک خانواده کمک بزرگی از نظر احتمال مبتلا شدن فرزندان دیگر فراهم خواهد نمود و میتوان در اصلاح آن کوشید.

مشخص نمودن اختلال متابولیسم اسیدهای آمینه احتیاج به یک روش سریع - 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 [۳ و ۲] بنابراین روش ساده آزمایش (Screen) که حساسیت کافی داشته باشد برای تشخیص اولیه کافی است معمولاً برای اینکار از گروماتوگرافی روی کاغذ استفاده میشود ولی چون در مسایعات بیولوژیک موادی مثل پروتئینها - نمکها و مولکولهای خنثی مثل کربوهیدرات و اوره وجود دارد که اثر نامطلوبی روی گروماتوگرافی اسید آمینه دارند [۴] بایستی پروتئین و نمک را از مسایعات بیولوژیکی نامبرده قبل از گروماتوگرافی حذف کرد.

در ضمن کاربرد این روش مستلزم وقت زیادی است. تعیین اسید آمینه را مستقیماً در پلاسما [۵] یا در خون یا در ادرار [۶]

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

Phthalaldehyde - O (۲/۰۰/در استن) پس از رنگ

آمیزی صفحه، در حرارت ۵۰ درجه بمدت ۱۰ دقیقه گذاشته میشود.

Pauly's reagent : الف - اسید سولفانیلیک ۰/۰۹

در اسید کلریدریک یک نرمال .

ب - نیتريت سدیم ۰/۰۵ .

ج - محلول اشباع شده کربنات

سدیم در آب .

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

Erlich reagent : ۵ سی سی از محلول ۰/۱۰

P - dimethylaminobenzaldehyde

در اسید کلریدریک غلیظ را با ۲۰ سی سی استن رقیق

نموده و صفحه کروماتوگرافی را رنگ نموده و چند دقیقه در گرما گذاشته میشود .

Iodo / Platinate reagent : به ۱۰ سی سی از محلول

۰/۰۰/۱ اسید کلروپلاتینیک در اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال ،

۰/۶ سی سی محلول یدوپتاسیم (۱۶۷ میلیگرم / سی سی) اضافه

میگردد [۸] در موقعی که از این محلول رنگ آمیزی استفاده

میشود از کروماتوگرافی روی لایه نازک سلولز تهیه شده روی

پلاستیک (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 کنترل و

استاندارد میباشد . برای تعیین غلظت تقریبی اسید آمینه از

رقت های مختلف استاندارد میتوان استفاده نمود . عکس شماره (۱)

کروماتوگرافی پلاسما و عکس شماره (۲) کروماتوگرافی ادرار را

نشانه : جوهر سیاه پارکر یک سی سی در ۱۲ سی سی ان

بوتانل (N . Butanol) حل نموده سانتریفوژ شده و مایع روئی

بعنوان نشانه استفاده می شود [۷] .

پلاسما ی مورد آزمایش در حرارت زیر صفر نگاهداری

میشود . از آن به مقدار ۵ میکرو لیتر در روی خطی بطول ۲

سانتیمتر گذاشته میشود . ادرار که قبلاً بوسیله مر تیولات نگاهداری

شده (یک قطره از محلول ۰/۱ دریک لیتر) در روی خطی بطول

۱/۵ سانتیمتر گذاشته میشود . مقدار مورد آزمایش ادرار بر حسب

مقدار کراتی نین ادرار تعیین میگردد [۶] .

ستون اول مقدار کراتی نین به میلیگرم در صد وستون دوم حجم

ادرار به میکرو لیتر است .

۲۰۱ + ۱۰۱-۲۰۰ ۵۱-۱۰۰ ۲۶-۵۰ ۱۶-۲۵ ۰-۱۵

۲ ۴ ۶ ۸ ۱۰ ۱۲

پس از گذاشتن نمونه ها، صفحه کروماتوگرافی را با هوای

گرم خشک نموده و در محلول حلال که باید روزانه تهیه گردد

گذاشته میشود .

محلول حلال : ان بوتانل ۳۵ سی سی - استن ۳۵ سی سی -

اسید استیک گلاسیال ۱۰ سی سی - آب مقطر ۲۰ سی سی . در

محلول فوق دوبار و هر بار ۵۰ دقیقه در حرارت ۲۵ درجه

کروماتوگرافی انجام میگردد . پس از خشک نمودن با هوای گرم

رنگ آمیزی میگردد .

محلول های رنگ آمیزی :

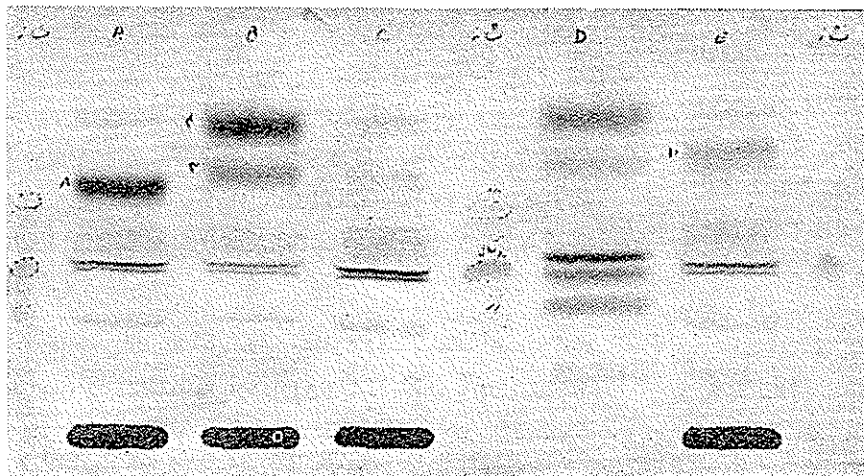
ناین هیدرین (Ninhydrin) (۵/۰۰/در استن) صفحه

کروماتوگرافی پس از رنگ آمیزی در حرارت ۴۰ درجه بمدت

۳۰ دقیقه گذارده می شود .

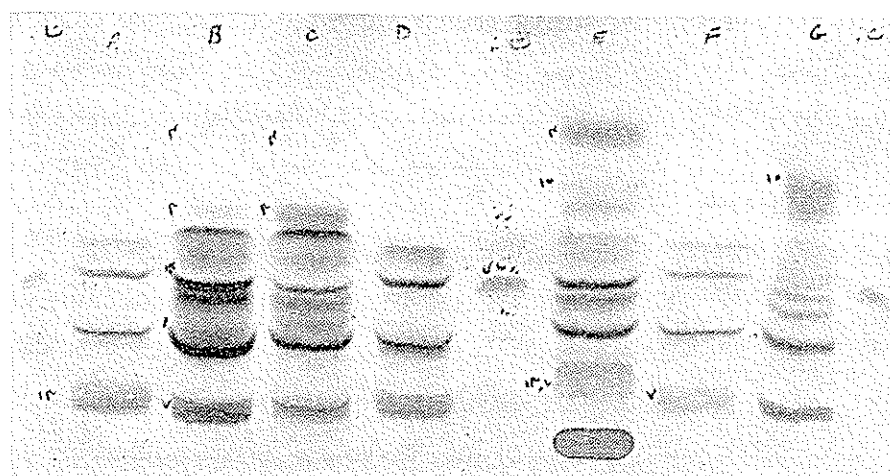
ایزاتین (Isatin) (۰/۰۱/در استن) پس از رنگ آمیزی

صفحه (Plate) در حرارت ۱۰۰ درجه بمدت ۵ دقیقه گذاشته می شود .



عکس شماره ۱ - کروماتوگرافی پلاسما :

- A - افزایش متیونین
- B - Maple syrup urine disease
- C - پلاسما ی کنترل
- D - پلاسما ی استاندارد
- E - افزایش فنیل آلانین .



عکس شماره ۳- کروماتوگرافی ادرار :
 A - افزایش هیستیدین .
 B - راشی کیسم تغذیه ای
 C- Maple syrup urine disease
 D- ادرار کنترل
 E - سندرم فانکو نی . F - سیستینوری
 G - فنیل کتو نوری .

آزمایش و محلول اسیدهای آمینه که مشکوک به افزایش می باشند
 توأمأ با کنترل کروماتوگرافی میشوند .

ایزاتین برای رنگ آمیزی پرولین بکار می رود . این اسید
 آمینه با ناین هیدرین رنگ پر تقالی خیلی کم رنگ و با ایزاتین
 رنگ آبی بخود میگیرد . محلول O - Phthalaldehyde
 برای مشخص نمودن هیستیدین و گلیسین و Pauly برای رنگ آمیزی
 هیستیدین و اریلیخ برای رنگ آمیزی تربیتوفان استفاده میشود رنگ
 یدو کلروپلاتینیک برای رنگ آمیزی سیستین ، سیستئین و متیونین
 بکار می رود و چون پلاتین روی آلومینیوم اثر کرده و پلاتین سیاه بوجود
 آورده و آب اکسیژنه آزاد می کند باین جهت برای استفاده از این
 رنگ آمیزی کروماتوگرافی روی سلولز آماده شده روی پلاستیک و با
 شیشه انجام می گردد . لوسین و ایزولوسین خیلی نزدیک بهم حرکت
 میکنند برای مشخص نمودن این اسیدهای آمینه مثلاً در بیماری Maple
 syrup urine disease [۲] از کروماتوگرافی یا حلال
 C - amyloalcohol ، متیل اتیل کتون و آب [۶۰-۲۰-۲۰] استفاده
 میشود . این حلال خیلی آهسته حرکت می کند 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 یک
 صفحه نازک کروماتوگرافی لازم است مخصوصاً برای تشخیص بین
 آمینواسید اوریهی 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 لوله ای کلیه
 وجود دارد [۳] این حالت در کودکان نارس طولانیتر است [۱۰]
 باین جهت در این سن برای کنترل از کودکان هم سن باید استفاده
 نمود و چندماه بعد نیز کروماتوگرافی را تکرار کرد .

باید توجه داشت که بیشتر آمینواسیدوریهی موقتی میباشدند .
 در یک تجربه از ۳۱۶ آمینواسیدوری فقط ۶ نفر از آنها دائمی

نشان میدهند که بطور واضح بیماران را مشخص کرده است . در این
 آزمایش از استاندارد یک عشم رقیق شده استفاده شده است . در
 کروماتوگرافی پلاسما در نقطه شروع کروماتوگرافی هانهای
 تشکیل میشود (عکس شماره ۱) این هاله در نمونه های تازه کمتر
 مشاهده میشود . علت بوجود آمدن آن مشخص نیست [۴] .
 چنانچه از عکسها مشاهده می شود نشانه سه رنگ ایجاد
 میکند . رنگ زرد با والین - رنگ پر تقالی 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

۱- گلیسین	۸ - متیونین
۲- آلانین	۹ - گلو تامین
۳- والین	۱۰- بتا فنیل آلانین
۴- لوسین	۱۱- تیروزین
۵- سرین	۱۲- لایزین
۶- تره اونین	۱۳- هیستیدین
۷- سیستین	۱۴- پرولین

بحث

کروماتوگرافی روی لایه نازک سلولز با مقایسه با کروماتوگرافی
 روی کاغذ بسیار حساس و سریع میباشد . [۹] و احتیاج به جدا کردن
 پروتئین و نمک نیست و از این نظر نیز در وقت صرفه جویی میشود .
 برای خواندن کروماتوگرافی ابتدا از رنگ آمیزی ناین هیدرین
 استفاده می شود با این رنگ تمام اسیدهای آمینه غیر از پرولین
 رنگ بنفش بخود میگیرند . نظر باینکه بعضی اسیدهای آمینه
 خیلی نزدیک بهم حرکت میکنند برای مشخص نمودن از رنگهای
 اختصاصی استفاده میشود . در رنگ آمیزی اختصاصی نمونه مورد

خلاصه

مشخص نمودن اسیدهای آمینه پلاسما و ادرار در بیماران مبتلا به اختلالات متابولیسم کمک مهمی به تشخیص کلینیکی مینماید. آزمایش روی لایه سلولز آماده شده روی آلومینیوم یک طریقه ساده و سریع برای تعیین اسیدهای آمینه موجود در مایعات فوق می باشد. در این طریقه به آماده کردن قبلی و گرفتن نمک و پروتئین ادرار و پلاسما احتیاجی نیست. نتایج خوبی با این طریقه برای مشخص نمودن مواد فنیل کتو نوری، سیستینوری و بیماری Maple syrup urine disease گرفته شده است.

نویسنده مقاله از جناب آقای دکتر ناصر گیتی استاد گروه طب تجربی و فارماکولوژی و جناب آقای دکتر شموئیل رهبر استاد گروه ایمنوولوژی بخاطر کمک و راهنمایی، و خانم مهوش فرشیان برای کمکهای تکنیکی و خانم نیره ملایری برای تایپ مقاله تشکر می نماید.

بوده اند [۱۱] از طرف دیگر افزایش بعضی از اسیدهای آمینه که همراه با عقب افتادگی روانی است در دوران کودکی بخوبی دیده میشود ولی در سالهای بعد افزایش اسید آمینه ثابت نیست [۱۲] باین جهت آزمایش اسیدهای آمینه در اوایل طفولیت برای تشخیص لازم است.

بعضی از شیرهای خشک حاوی مقدار فراوانی اسید آمینه مثلاً D-L methionine [۱۳] میباشد که باعث دفع آن اسید آمینه در ادرار می شود. در بعضی از بیمارهای غیر کلیوی نیز مثل راشی تیسیم تغذیه ای آمینو اسیدوری منتشر دیده می شود [۳ و ۸].

برای مطالعه دقیق از نظر جزئیات اختلال متابولیسم اسیدهای آمینه احتیاج به کروماتوگرافی دو طرفی و دستگاه جدا کننده اسید آمینه می باشد. در بخش طب تجربی و فارماکولوژی از طریقه میکرومند [۸] برای کروماتوگرافی دو طرفی استفاده می شود.

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 .