رزین تبادگر کاتیونی بر پایه پلی بوتیل متاکریلات در اندازه‌گیری هموگلوبین A_{1c}

مریم نیکخو
تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، دانشکده شیمی

حبیب‌اله بهاروند*+
تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران

همایون احمدپناهی
تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، دانشکده شیمی

چکیده: اندازه‌گیری پروتیین‌های گلیکوله شده در پایش بلند مدت گلوکز خون به‌ویژه در مورد بیماران دیابتی کاربرد دارد. امروزه یکی از فناوری‌های مرسوم در جداسازی و شناسایی این نوع پروتیین‌ها، استفاده از تبادل‌گرهای کاتیونی به شکل ستون‌های میکرو است. یکی از انواع این رزین‌های سنتزی بر پایه پلی بوتیل متاکریلات است. در این مطالعه، رزین بر پایه پلی بوتیل متاکریلات با استفاده از روش پلیمریزاسیون تعلیقی با ساختارهای شیمیایی و فیزیکی گوناگون سنتز و تعیین هویت شد. اسپکتروسکوپی FTIR حضور گروه‌های اسیدی کربوکسیلیک را در رزین تأیید کرد. با استفاده از دستگاه تعیین سطح ویژه (BET) و میکروسکوپ روبشی الکترونی (SEM) به ترتیب سطح ویژه ذره‌های رزین تعیین و ماکروپور بودن رزین نشان داده شد. اسپکتروسکوپی UV/VIS برای تعیین قابلیت رزین در جداسازی هموگلوبین A_{1c} استفاده شد. سرانجام مناسب بودن رزین تعویض یون کاتیونی سنتز شده با ساختاری ماکرو پور و ظرفیت تبادل یون ۳٫۰۸۳ میلی اکی والان بر گرم رزین خشک، در جداسازی HbA_{1c} نشان داده شد.

واژه‌های کلیدی: پلیمریزاسیون تعلیقی، رزین تبادل گر یون، پلی بوتیل متاکریلات، هموگلوبین گلیکول دار شده.

KEY WORDS: *Suspension polymerization, Ion-exchange resin, Polybutyl methacrylate, Glycosylated hemoglobin.*

مقدمه

تبادل‌گرهای یونی، موادی جامد و غیر قابل حل و حامل گروه‌های عاملی کاتیونی، آنیونی و یا کیلیت کننده هستند و از آنها، تبادل‌گرهای آلی (پلیمر ژل‌های شبکه‌ای شده) مهمتر هستند. ویژگی‌های تبادل‌کنندگی آنها می‌تواند از روش پلیمریزاسون

*عهده دار مکاتبات
+E-mail: h.baharvand@ippi.ac.ir

مونومرهای عامل‌دار، پیوند پلیمر از قبل تهیه شده‌ای با پلیمری عامل دار، و یا اصلاح شیمیایی پلیمرهای شبکه‌ای شده با موادی که دارای گروه‌های عاملی مناسب هستند، امکان پذیر شود. یکی از مهمترین کاربردهای این نوع رزین‌ها، استفاده از آنها در صنایع پزشکی، برای جداسازی پروتیین‌ها و تشخیص پاراکلینیکی است. انواع زیادی رزین تبادل‌گر یون وجود دارند، برای مثال رزین‌های تبادل‌گر یون با پایه پلی استایرن شبکه‌ای شده با دی وینیل بنزن [۳]، که با توجه به آسان بودن عامل دار شدن آن، یکی از مهمترین این نوع مواد است [۸-۱]. کوپلیمرهای استایرن ـ دی وینیل بنزن (PS-DVB)، با درصدهای گوناگونی از دی وینیل بنزن (۸ تا ۲۵ ٪)، دارای مقاومت بالایی هستند، بنابراین می‌توانند در فشار بالا و با فازهای متحرک گرادیانی، به کار روند. درصد شبکه‌ای شدن را به عنوان درصد دی وینیل بنزن واکنش داده با استایرن در نظر می‌گیرند، بعد از پلی استایرن‌ها پلیمرهای اکریلیکی مهمترین کاربرد را در تهیه رزین‌های تبادل‌گر یونی دارند [۳]. کوپلیمریزاسیون ۲-هیدروکسی اتیل متاکریلات با اتیلن گلیکول دی متاکریلات که اسفرون[۱] نامیده می‌شوند از این نوع رزین‌هاست. پلیمرهای اکریلیکی نرم‌تر از پلی استایرن هستند، بنابراین کاربردشان در ستون‌های بسته و تحت فشار، مناسب نیست ولی با توجه به هیدروفیل بودن، برای جداسازی پروتیین‌ها مناسب هستند. اختلاف مهم دیگرشان این است که پلیمرهای اکریلیکی دارای ویژگی آروماتیک کم هستند، بنابراین، آنها استعداد جذب ترکیب‌های آروماتیک غیر یونی را ندارند ولی در مورد پلی استایرن‌ها این مشکل وجود دارد. گروه مهم دیگری از رزین‌های تبادل‌گر یون که به عنوان فاز ساکن در جداسازی پروتیین‌ها استفاده می‌شوند، رزین‌های با پایه دکستران، شبکه‌ای شده با اپی کلرو هیدرین و یا سلولز که دارای گروه‌های هیدروکسیل فراوان است، می‌باشند [۳]. این نوع رزین‌ها دارای گروه‌های یونی نیستند، اما قطبی هستند و دارای گستره‌ی وسیعی از اندازه‌ی تخلخل هستند. برای کاربردهای تبادل یون این نوع رزین‌ها یا با گروه‌های یونی مثل دی اتیل آمینو اتیل به عنوان رزین تبادل گر آنیونی و یا با گروه‌های کربوکسیلیک به‌عنوان رزین تبادل‌گر کاتیونی اصلاح می‌شوند. این مواد نرم هستند که می‌بایست در ستون‌های باز مورد استفاده قرار گیرند و امروزه هنوز از آنها به‌طور گسترده استفاده می‌شود [۱۰ ، ۹]. به تازگی *مولر* و *همکاران*، گروه جدیدی از تبادل‌گرهای یونی معرفی کرده‌اند که در آنها گروه‌های تبادل یون روی یک پلیمر خطی متصل به یک فاز ماکروپور قرار دارند [۱۱]. زنجیرهای پلیمر خطی در اینجا شامل ۵ تا ۵۰ مونومر به شکل برس با ضخامت تا ۵۰ μm است که درون پورها قرار می‌گیرند. به این نوع رزین‌ها EMD یا Tentacle-Type Fractogel گفته می‌شود. با این نوع تبادل‌گرهای یونی انتقال جرم تندتر انجام شده و انتخاب پذیری تغییر می‌کند [۱۱]. برای مثال پروتیین‌ها می‌توانند (درصورت استفاده از تبادل‌گرهای مرسوم) فقط با تعداد و سطوح ویژه‌ای از رزین در تقابل باشند ولی با کاربرد تبادل‌گرهای Tentacle، با توجه به قابلیت انعطاف آرایش بار، امکان تقابل‌های الکترواستاتیکی دیگری نیز می‌باشد که سرانجام باعث تغییر انتخاب پذیری می‌شود. علاوه بر این موردها تبادل‌گرهای یونی می‌توانند دارای پایه سیلیکایی نیز باشند. برای مثال ذرات متخلخل سیلیکایی برای کاربردهای کروماتوگرافی از هیدرولیز اتیل ارتوسیلیکات در حلال‌ها ساخته می‌شوند [۱۲ ، ۳]. چنان‌که اشاره شد یکی از مهمترین کاربردهای این نوع رزین‌ها، در آزمون‌های پاراکلینیکی است، برای مثال اندازه‌گیری پروتیین‌های گلیکول‌دار شده می‌تواند در پایش گلوکز، به‌ویژه، در مورد بیماران دیابتی، کاربرد داشته باشد [۱۶ـ۱۳]. هموگلوبین انسانی یک فرد بزرگسال (Hb) به طور معمول شامل Hb A (۹۷٪ از کل)، $Hb\ A_2$ (۲٫۵ ٪)، و Hb F (۰٫۵ ٪) می‌باشد. Hb A از چهار زنجیر پلی پپتیدی، دو تا از نوع α- و دو تای دیگر از نوع β- تشکیل شده است. تجزیه‌های کروماتوگرافی Hb A، وجود چند جزء کوچک هموگلوبین‌ها، شامل $Hb\ A_{1a}$ ، $Hb\ A_{1b}$ و $Hb\ A_{1c}$ که در مجموع به عنوان $Hb\ A_1$ شناخته می‌شوند را نشان می‌دهند و با توجه به حرکت یا مهاجرت تندتر آنها نسبت به اجزای دیگر Hb A ، در یک میدان الکتریکی به گلیکو هموگلوبین معروف هستند. امروزه یکی از فناوری‌های مرسوم و موفق در جداسازی و شناسایی این نوع پروتیین‌ها، استفاده از ستون‌های تبادل‌گر کاتیونی به شکل ستون‌های مبادله کننده یونی میکرو است [۲۰ ـ ۱۷]. با توجه به اینکه در این فناوری فاز ساکن یا رزین تبادل‌گر کاتیونی نقش اصلی را بازی می‌کند، سنتز یکی از انواع رزین‌ای تبادل گر کاتیونی که در اندازه گیری هموگلوبین A_{1C} کاربرد دارد، هدف گذاری شده است. این رزین‌ها با استفاده از روش‌های پلیمریزاسیون تعلیقی[۲] با ساختار شیمیایی و فیزیکی گوناگون سنتز و با استفاده از فناوری‌های آزمایشگاهی شامل اسپکتروسکوپی UV، FTIR، BET، SEM تجزیه و کارایی آنها مطالعه شد.

(۱) Spheron

(۲) Suspension polymerization

بخش تجربی

مواد و تجهیزات

مونومر بوتیل متاکریلات، عامل شبکه‌ای‌کننده‌ی اتیلن گلیکول دی متاکریلات و پلی وینیل الکل بـه عنـوان امولسیفایر فراورده‌ی مرک، آزوبیس ایزو بوتیرو نیتریل (AIBN) به‌عنوان شروع کننده محصول فلوکا، کومونومر اکریلیک اسید، عامل ایجاد تخلخل n - دودکانول، سدیم دی هیدروژن فسفات و دی سدیم هیدروژن فسفات، فتالیک انیدرید، تریتون x-100 همگی محصول مرک خریداری شد. تجهیزات به‌کار گرفته شده عبارتند از: اسپکترومتر FTIR مدل EQUINOX 55 شرکت Brucker آلمان، BET مدل CHEMBET 3000 شرکت Quantachrome Corporation آمریکا، SEM مدل VEGA شرکت TESCAN آمریکا، اسپکتروفتومتر UV/VIS مدل JASCO V-530 ژاپن. با استفاده از دستگاه ایمونوتربیدومتری مدل Cobas Integra شرکت Roche سوییس، غلظت HbA_{1c} اندازه‌گیری و به‌عنوان مقدارهای استاندارد در نظر گرفته شدند.

تهیه رزین

برای تهیه رزین ماکروپور به روش پلیمریزاسیون تعلیقی محلول همگن فاز مونومر شامل بوتیل متاکریلات، اتیلن گلیکول دی متاکریلات، آزوبیس ایزو بوتیرو نیتریل (AIBN)، اکریلیک اسید، n- دودکانل، در محلول آب و پلی وینیل الکل پخش شد. پلیمریزاسیون مونومر پخش شده در ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. بعداز پایان پلیمریزاسیون با افزودن سود، رزین به شکل نمک سدیم در آمد. ذرات پلیمری به دست آمد با آب مقطر، متانل و استون به طور کامل شسته شد و برای خشک شدن در آون ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. با استفاده از این فناوری رزین‌های تبادل‌گر یون با اندازه ذرات و ظرفیت‌های گوناگون تبادل یون سنتز شد. فرمولاسیون‌های مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.

تعیین ظرفیت تبادل یون رزین[۲۱]

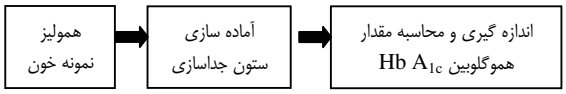
ذرات تهیه شده در آب مقطر به مدت ۵ روز شسته و خشک شد. سپس حدود ۰/۳ گرم از رزین خشک شده به‌طور دقیق توزین و به یک بالن ۱۵۰ میلی لیتری انتقال داده شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید ۰/۲ نرمال به آن اضافه شد. محلول در حال به‌هم خوردن برای مدت ۲۰ ساعت در دمای اتاق (۲۴ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) نگهداری شد. سپس ۵ میلی لیتر از محلول شفاف اسیدی بالای ذرات رزین با محلول ۰/۱ نرمال سود تیتر شد. با تعیین تفاوت مقدار اسید باقی مانده از مقدار اولیه اسید، ظرفیت تبادل یون رزین به‌کمک معادله (۱) محاسبه شد.

$$C = \frac{n}{w} \times ۱۰۰۰ \qquad (۱)$$

که در آن C- ظرفیت تبادل یون بر حسب میلی اکی والان بر گرم رزین خشک، n- تعداد اکی والان اسید مصرفی، و w- وزن رزین خشک توزین شده بر حسب گرم است.

اندازه گیری هموگلوبین گلیکول دار شده [۲۲]

اندازه گیری هموگلوبین گلیکول دار شده طبق مرحله‌های زیر انجام شد.



همولیز نمونه خون

برای تهیه نمونه خون، محلول همولیزانت شامل فتالیک انیدرید با غلظت ۵۰ mmol/L و تریتون X-100 با غلظت ۵ g/L (به عنوان دترجنت) تهیه شد. pH محلول توسط محلول پتاسیم هیدروکسید با غلظت ۵۰ mmol/L روی ۵ تنظیم شد. ۵۰ میکرولیتر از نمونه خون با ۱۰۰میکرولیتر محلول همولیزانت تهیه شده مخلوط و با استفاده از یک همزن تکان دهنده به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه به شدت به هم زده شد.

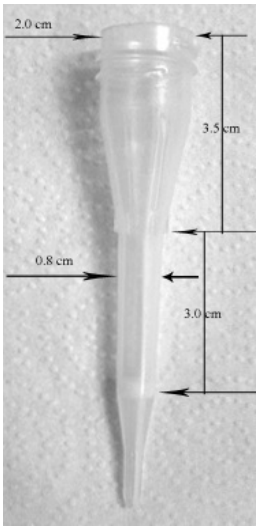
آماده سازی ستون جداسازی

لوله پلاستیکی از جنس پلی اتیلن به قطر داخلی ۴ میلیمتر و ارتفاع ۶۰ میلیمتر که انتهای بالایی ان پهن تر، به قطر ۱۵ میلیمتر و طول ۲۰ میلیمتر که به‌عنوان مخزن فاز متحرک استفاده می‌شود، تهیه شد (شکل ۲). انتهای پایینی این ستون پلاستیکی دارای نوعی صافی است که از خروج رزین از ستون جلوگیری می‌کند. قبل از اضافه کردن رزین به ستون ابتدا مقدار ۳۰ گرم از رزین تهیه شده به ۴۰۰ میلی لیتر اب مقطر اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در خلاء گاز زدایی شد.

پس از ته نشین شدن رزین، آب مقطر روی رزین تخلیه شد و دوباره ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر به رزین اضافه و با فسفریک اسید ۸۵ درصد pH این سوسپانسیون به ۶/۱ رسـانده شـد. بعـد از ایـن

جدول ۱ـ فرمولاسیون‌های به‌کار رفته در سنتز رزین‌های تبادل یون.

نمونه	آب (میلی لیتر)	پلی وینیل الکل (گرم)	n– دودکانل (گرم)	اکریلیک اسید (گرم)	آزوبیس ایزو بوتیرو نیتریل (گرم)	اتیلن گلیکول دی متاکریلات (گرم)	بوتیل متاکریلات (گرم)
۱	۲۰۰	۰/۱۵	۱۰	۲	۰/۱۵	۱۰	۲۵
۲	۲۰۰	۰/۱۵	۱۰	۵/۴	۰/۱۵	۱۰	۲۵
۳	۲۰۰	۰/۱۵	۱۰	۶	۰/۱۵	۱۰	۲۵
۴	۲۰۰	۰/۱۵	۱۰	۸/۷	۰/۱۵	۱۰	۲۵
۵	۲۰۰	۰/۱۵	۱۰	۱۰	۰/۱۵	۱۰	۲۵



شکل ۱ـ اندازه‌ها و شکل ظاهری لوله پلاستیکی استفاده شده در ساخت ستون‌های تبادل‌گر یون.

مرحله آب روی رزین تخلیه و بااضافه کردن بافر ۷۲ میلی مول بر لیتر، pH محلول روی رزین به ۶/۳۸ رسید. سرانجام ۰/۵ گرم از رزین آماده شده به شکل دوغاب در بافر۷۲ میلی مول بر لیتر و در حال تعادل با آن به درون ستون منتقل شد.

اندازه‌گیری و محاسبه مقدار هموگلوبین $Hb\ A_{1c}$

به‌منظور کاهش قدرت یونی محیط رزین داخل ستون آماده شده در مرحله قبل، بافر ۷۲ میلی مول بر لیتر موجود روی رزین را تخلیه شده،۱۰ میلی لیتر بافر با قدرت یونی۳۰ میلی مول بر لیتر از روی رزین عبور داده شد. برای جداسازی هموگلوبین گلیکول‌دار بعد از تخلیه کامل بافر ۳۰ میلی مول بر لیتر از روی رزین،۵۰ میکرو لیتر از خون همولیز شده را روی رزین داخل ستون قرار داده شد و با استفاده از یک پیپت، ۲میلی لیتر بافر ۳۰ میلی مول بر لیتر به داخل ستون افزوده شد. نمونه خون روی قسمت کوچکی از رزین، در بالای ستون طی یک فرایند تبادل یون جذب رزین می‌شود. وقتی به طور کامل بافر ۳۰ میلی مول بر لیتر از ستون تخلیه شد، ۴ میلی لیتر بافر ۷۲ میلی مول بر لیتر به داخل ستون اضافه کرده و از روی رزین عبور داده شد. خروجی زیر ستون دارای HbA_{1c} جمع آوری شده و میزان جذب آن در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل آب مقطر به عنوان بلانک توسط اسپکتروفتومتر UV/VIS اندازه گیری شد.

برای اندازه گیری جذب مربوط به Hb_{TOTAL} ، درون یک لوله آزمایش ۱۲میلی‌لیتر از بافر ۷۲ میلی مول بر لیتر را با ۵۰ میکرولیتر خون همولیز شده مخلوط و به شدت به هم زده شد. سپس میزان جذب مربوط به $A_{HbTOTAL}$ در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل آب مقطر اندازه‌گیری شد. مقداردرصد HbA_{1c} در نمونه به کمک معادله (۲) محاسبه شد.

$$\%HbA_{1c} = \frac{A_{HbA_{1c}} \times V_{HbA_{1c}}}{A_{HbTOTAL} \times V_{HbTOTAL}} \times 100 \qquad (۲)$$

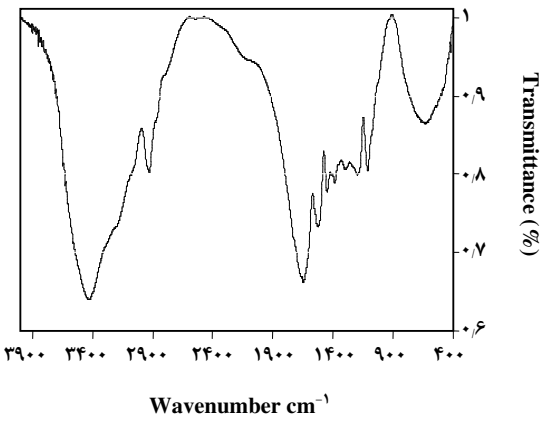
که در این معادله $V_{HbA_{1c}}$ حجم مخلوط نمونه هموگلوبین جداسازی شده در بافر ۷۲ میلی مول بر لیتر، $V_{HbTOTAL}$ حجم مخلوط هموگلوبین کل در بافر ۷۲ میلی مول بر لیتر، A_{HbA1c} جذب اندازه گیری شده مربوط به HbA_{1c} و $A_{HbTOTAL}$ جذب اندازه گیری شده مربوط به Hb_{TOTAL} می‌باشد.

نتیجه‌ها و بحث

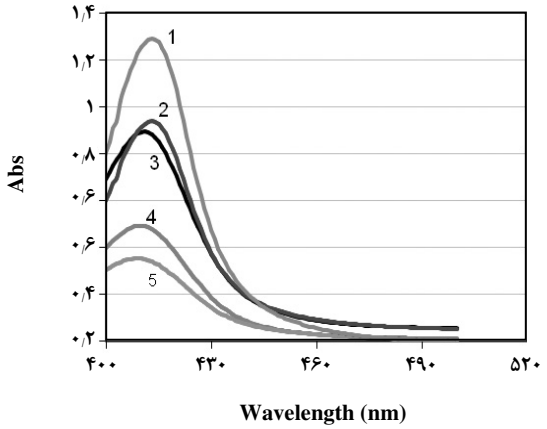
همانطور که پیش‌تر اشاره شد فناوری کروماتوگرافی تبادل یون از فناوری‌های مرسوم و موفق در جداسازی و شناسایی پروتئین‌ها است. در این پژوهش یکی از انواع رزین‌های تبادل یون سنتز و در اندازه‌گیری هموگلوبین A_{1C} به‌کار گرفته شد. رزین‌های سنتز شده در این مطالعه با استفاده از روش پلیمریزاسیون تعلیقی با ساختار شیمیایی و

جدول ۲ـ مقدارهای $\%HbA_{1C}$ اندازه گرفته شده با استفاده از رزین‌های سنتز شده برای فرمولاسیون‌های مختلف ساخت رزین.

نمونه رزین	ظرفیت تبادل یون رزین (میلی اکی والان بر گرم رزین خشک)	A_{HbA1C}	$A_{HbTOTAL}$	$\%HbA_{1C}$
۱	۰/۷۵	۱/۳۲۹	۱/۲۳	۳۶/۰۱۳
۲	۱/۹۲۱	۰/۹۶۹۲	۱/۲۳	۲۶/۲۶۴
۳	۲/۰۳۰	۰/۸۷۶۵	۱/۲۳	۲۳/۷۵۱
۴	۲/۸۰۶	۰/۴۹۳	۱/۲۳	۱۳/۳۶
۵	۳/۰۸۳	۰/۳۵۴	۱/۲۳	۹/۵۹



شکل ۲ـ نمونه طیف FTIR رزین تهیه شده با بیس کوپلیمر (اکریلیک اسید - بوتیل اکریلات).



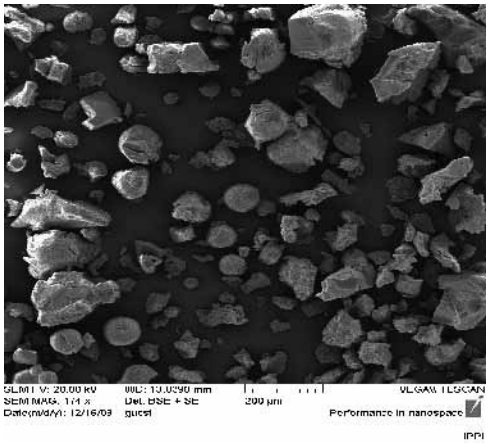
شکل ۳ـطیف جذبی UV/VIS نمونه ی ارای هموگلوبین، جدا سازی شده از روی رزین‌ها با ظرفیت تبادل یون گوناگون (میلی اکی والان بر گرم رزین خشک):(۱) ۰/۷۵ ؤ (۲) ۱/۹۲۱ ؤ (۳) ۲/۰۳۰ ؤ(۴) ۲/۸۰۶ و (۵) ۳/۰۸۳ .

فیزیکی گوناگون سنتز و تعیین هویت شد. در مطالعه اسپکتروسکوپی IR رزین‌ها حضور پیک جذبی در ناحیه cm^{-1} ۱۷۶۰ ـ ۱۶۹۰ شاهد حضور گروه‌های اسیدی کربوکسیلیک، حضور پیک در ناحیه cm^{-1} ۳۰۰۰ ـ ۲۸۰۰ شاهد حضور گروه‌های CH_2 و CH_3 در زنجیر پلیمری و حضور پیک در ناحیه cm^{-1} ۳۶۰۰ ـ ۳۲۰۰ نشان‌دهنده وجود پیوندهای هیدروژنی گروه‌های هیدروکسیل است (شکل ۲).

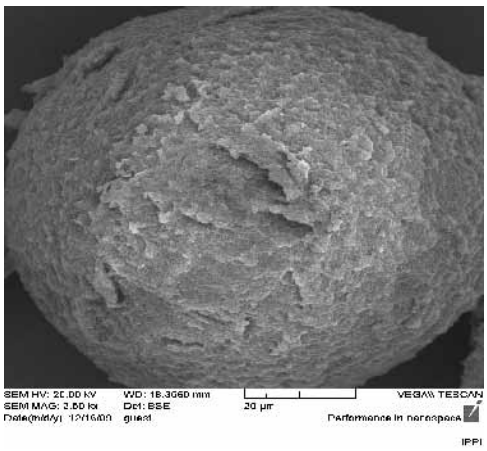
از پارامترهای اصلی تعیین کننده کارایی و قدرت جداسازی این نوع رزین‌ها برای یک کاربرد خاص، دانسیته بار الکتریکی و ظرفیت تبادل یون رزین است، با تغییر مقدار اکریلیک اسید به‌کار رفته در سنتز رزین، رزین‌هایی با ظرفیت تبادل یون گوناگون تهیه و کارایی آنها در جداسازی مورد نظر مطالعه شد. نتیجه‌های به دست آمده از اندازه‌گیری ظرفیت تبادل یون رزین‌های گوناگون سنتز شده در جدول ۲ آمده است. همان‌گونه که در این جدول دیده می‌شود رزین‌هایی با ظرفیت تبادل یون از ۰/۷۵ تا ۳/۰۸۳ میلی اکی والان بر گرم رزین خشک، سنتز شدند.

برای مطالعه کارایی رزین‌های سنتز شده در اندازه گیری هموگلوبین گلیکول‌دار شده از یک نمونه خون با مقدار هموگلوبین $Hb\ A_{1c}$ مشخص، که مقدار $\%HbA_{1C}$ در آن توسط دستگاه Cobas Integra اندازه گرفته شده (برابر با ۸/۵) همولیز شد و با استفاده از ستون‌های مورد مطالعه، هموگلوبین $Hb\ A_{1c}$ آن طبق روش بیان شده، جداسازی و اندازه‌گیری شد. نتیجه‌های به دست آمده از این اندازه‌گیری‌ها در جدول ۲ آمده است. همان‌طور که دیده می‌شود با افزایش ظرفیت تبادل یون رزین‌ها از ۰/۷۵ تا ۳/۰۸۳ میلی اکی والان بر گرم رزین خشک، مقدار اندازه گیری شده هموگلوبین $Hb\ A_{1c}$ به مقدار شناخته شده نزدیک‌تر می‌شود. همین نتیجه از تغییرهای منحنی جذب طیف UV/VIS اسپکتروفتومتر از نمونه‌ی دارای هموگلوبین، جدا سازی شده از روی رزین‌های ۱ تا ۵ نیز دیده می‌شود (شکل ۳).

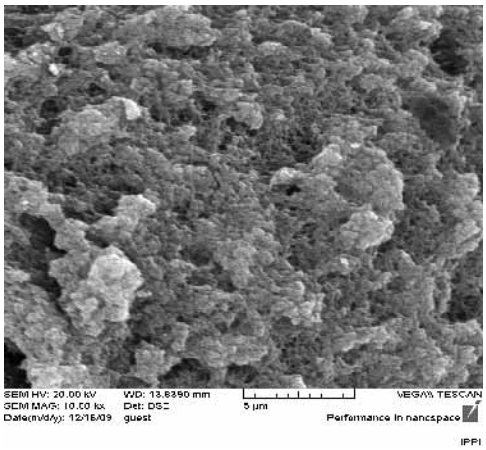
هموگلوبین، جدا سازی شده از روی رزین‌ها با ظرفیت تبادل



شکل ۴ـ میکروگراف SEM نمونه سنتز شده، با بزرگنمایی ۱۷۴.



شکل ۵ـ میکروگراف SEM نمونه سنتز شده، با بزرگنمایی ۲۵۰۰.



شکل ۶ ـ میکروگراف SEM نمونه سنتز شده، با بزرگنمایی ۲۵۰۰.

یون گوناگون (میلی اکی والان بر گرم رزین خشک):(۱) ۰/۷۵ ، (۲) ۱/۹۲۱ ، (۳) ۲/۰۳۰ ،(۴) ۲/۸۰۶ و (۵) ۳/۰۸۳ .

برای رسیدن به نقطه‌ی دلخواه در اندازه‌گیری هموگلوبین $Hb\ A_{1c}$ از رزین نمونه ۵ استفاده شد و برای افزایش قدرت جداسازی بافر، به ازای هر لیتر بافر، مقدار ۰/۳۵گرم سدیم کلرید به بافر اضافه شد. که در این حالت مقدار هموگلوبین $Hb\ A_{1c}$ اندازه گیری شده به مقدار واقعی بسیار نزدیک شد.

برای مطالعه مورفولوژی سطح ذرات و اندازه‌های ذره‌های سنتز شده از SEM استفاده شد. همان‌گونه که میکروگراف‌های گرفته شده از ذره‌ها نشان می‌دهند (شکل های ۴ تا ۶)، ذره‌های پلیمری سنتز شده دارای ساختار ماکرو پور، و از نظر هندسی بی شکل هستند. همچنین بیشتر ذره‌ها دارای حفره‌های با اندازه مناسب ۴۰ تا ۱۰۰ میکرون هستند که برای کروماتوگرافی تبادل یون در فشار پایین مناسب است.

برای تعیین سطح ویژه ذرات از BET استفاده شد. این کمیت برای نمونه شماره ۵ اندازه‌گیری شد و برابر است با ۸/۴۱۱۸ مترمربع بر گرم رزین که به مقدارهای نمونه‌های تجاری نزدیک است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش یکی از انواع رزین‌های مبدل یون کاتیونی با بیس پلی بوتیل متاکریلات به روش پلیمریزاسیون تعلیقی سنتز شد. رزین سنتز شده با استفاده از فناوری‌های گوناگون آزمایشگاهی تعیین هویت و قابلیت آن در جداسازی هموگلوبین A_{1c} مطالعه شد. سرانجام، نشان داده شد رزین مبدل یون کاتیونی سنتز شده با ساختاری ماکرو پور و ظرفیت تبادل یون ۳/۰۸۳ میلی اکی والان بر گرم رزین خشک، برای جداسازی HbA_{1c} مناسب است.

تاریخ دریافت : ۱۳۸۸/۱۲/۲۷ ؛ تاریخ پذیرش : ۱۳۸۹/۹/۲۲

مراجع

[1] Small H., "Ion Chromatography". Plenum Press, New York, (1989).

[2] Haddad P.R., Jackson P.F., "Ion Chromatography". Elsevier, Amsterdam, (1990).

[3] Walton H.F, Rocklin R.D., "Ion Exchange in Analytical Chemistry". CRC Press, Boca Raton, (1990).

[4] Weiss J., "Ionenchromatographie", Wiley-VCH, Weinheim, USA, p. 952 (1993).

[5] Helffrerich F., "Ion Exchange", McGraw-Hill, New York, USA, (1962).

[6] Dasgupta P.K., Ion Chromatography: The State of the Art., *Anal.Chem.* **64**, p. 775 A (1992).

[7] Dyer A., Hudson M.J., Williams P.A., (Editors), "Ion Exchange Processes: Advances and Applications", Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 371, (1993).

[8] Dorfner K., (Ed.), "Ion Exchange", Walter de Gruyer & Co., Berlin, p. 1451 (1991).

[9] Yamamoto S., "Ion Exchange Chromatography of Proteins", Marcel Dekker, New York, p. 401, (1988).

[10] Gooding KM, Regnier F.E., (Eds.), "HPLC of Biological Macromolecules". Marcel Dekker, New York, p. 457 (1990).

[11] Muller W., New Ion Exchangers for the Chromatography of Biopolymers. *J. Chromatog,* **510**, p. 133 (1990).

[12] Smith R.L., Pietrzyk D.J., Liquid Chromatographic Separation of Metal Ions on a Silica Column. *Anal. Chem.,* **56**, p. 610 (1984).

[13] Rahbar, S., Abnormal Hemoglobin in Red Cells of Diabetics. *Clin. Chim. Acta*, **22**, p. 296 (1968).

[14] Schnek A.G., Schroeder W.A., The Relation Between the Minor Components of Whole Normal Human Adult Hemoglobin as Isolated by Chromatography and Starch Block Electrophoresis, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, p. 142 (1961).

[15] Rahbar S., Blumenfeld O., Ranney H.M., Studies of Unusual Hemoglobin in Patients with Diabetes Mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, p. 838 (1969).

[16] Trivelli L.A., Ranney H.M., Lai H.T., Hemoglobin Components in Patients with Diabetes Mellitus, *N. Engi. J. Med.,* **284**, p. 353 (1971).

[17] Kynoch P.A.M., Lehmann H., Rapid Estimation (2.5h) of Glycosylated Hemoglobin for Routine Purposes, *Lancet ii,* **310**, p. 16 (1977).

[18] Welch S.G., Boucher B.J., A Rapid Micro-Scale Method for the Measurement of Haemoglobin $A_{1(a+b+c)}$. *Diabetologia,* **14**, p. 209 (1978).

[19] Chou J., Robinson C.A.Jr., Spiegel A.L., Simple Method for Estimating Glycosylated Hemoglobins, and Its Application to Evaluation of Diabetic Ppatients, *Clin. Chem.,* **24**, p. 1708 (1978).

[20] Abraham E.C., Huff T.A., Cope N.D., Wilson, J.B., Bransome, E.D., Determination of the Glycosylated Hemoglobins (Hb A1) with a New Microcolumn Procedure, *Diabetes,* **27**, p. 931 (1978).

[21] Chithambara Thanoo B., Jayakrishnan A., Preparation of Hydrogel Beads from Crosslinked Poly(Methyl Methacrylate) Microspheres by Alkaline Hydrolysis, *J. Applied Polym. Sci.,* **39**, p. 1153 (1990).

[22] Bissé E, Abraham EC. New Less Temperature-Sensitive Microchromatographic Method for the Separation and Quantitation of Qlycosylated Hemoglobins Using a Non-Cyanide Buffer System, *J. Chromatog.*, **344**, p. 81 (1985).