

新型固液双重致孔球形离子交换剂的制备 及其性能研究*

吴 蕾 甘一如 孙 彦**

(天津大学化工学院生物化工系 天津 300072)

摘 要 以甲基丙烯酸缩水甘油酯为单体,采用固液联合致孔方式,通过一步悬浮聚合制备了一种新型双孔高分子球形载体.经化学修饰后,得到含二乙胺羟丙基的阴离子交换剂(介质 A).优化了制备条件.并与用相同方法制备的但仅含有机溶剂致孔剂的介质 B 进行了比较.介质 A 和 B 均具有较高的静态吸附容量和机械强度.由于介质 A 内含有流动相可以对流通过的大孔,因此其动态吸附容量远高于介质 B,并且在较高的流速下表现出较好的色谱流动性能.

关键词 双孔介质, 悬浮聚合, 离子交换剂, 吸附, 牛血清白蛋白

微米级聚合物微球,作为功能高分子材料,在生物化学,分析化学,免疫医学及某些高新技术领域中有着广泛的用途^[1].聚甲基丙烯酸缩水甘油酯微球是一种富含环氧基的功能高分子材料,既具备特定的物理结构,又有良好的化学反应性能^[1],以此类微球为固定相的离子交换层析可应用于生物大分子,尤其是蛋白质的分离纯化.传统的层析介质填充的色谱柱在实际操作中,流动相从粒子周边流过,溶质靠扩散进入球形粒子内部,而蛋白质等生物大分子,相对分子质量大,内扩散阻力大,因此当流速大幅度提高时,离子交换剂的动态吸附容量和分离效率均明显下降.Fernandez 等对阴离子交换色谱分离蛋白质的传质过程的研究表明,蛋白质在介质颗粒内的扩散传质与颗粒外的流体力学性质无关^[2].这表明色谱传质过程的强化应着眼于加速介质颗粒孔内的传质过程^[3].Van Kreveland 指出,如果在层析填料颗粒上有横穿粒子的超大的对流传质孔,则能明显加快传质速度^[4].灌注层析^[5]和超孔琼脂糖^[6]填料是目前成功应用于生物物质分离的两类双孔型分离介质,但这两类双孔介质的制备方法复杂,合成成本较高.

在前期的研究中,本研究室开发了一种固液联合致孔技术,制备了新型双孔介质^[7,8].该技术的核心是采用超细硫酸钠晶体为固体致孔剂,通过原位聚合合法合成聚合物单块,研碎后溶解除去硫酸钠晶体(固体致孔剂),溶剂抽提除去有机致

孔剂,即可制备出双孔介质.但是,由于该介质为不定型颗粒,色谱柱背压较高,限制了其在高流速下的应用.因此,本文将该技术引申到悬浮聚合过程,利用超细碳酸钙颗粒为固体致孔剂,环己醇和十二醇为有机致孔剂,通过一步悬浮聚合合成了双孔球形介质,研究了该介质的性质、静态吸附容量和色谱性能,并与只含微孔(扩散孔)的介质进行了比较.

1 材料与方法

1.1 实验材料

甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA) > 99% (质量分数,下同),苏州安利化工厂;双甲基丙烯酸乙二醇酯(EDMA) > 98%,美国 Sigma 公司;偶氮二异丁腈(AIBN),分析纯,天津大沽化工厂,经无水乙醇重结晶后使用;环己醇,分析纯,天津化学试剂一厂;十二醇,分析纯,天津化学试剂六厂二分厂;超细碳酸钙颗粒(平均粒径 0.8 μm),广西恩平市广平化工公司;二乙胺,分析纯,沈阳市新西试剂厂;牛血清白蛋白(BSA),分析纯,美国 Sigma 公司.其余试剂均为分析纯.

1.2 离子交换剂的合成

1.2.1 双孔和微孔介质的制备 双孔介质(A)的制备,将一定比例的 GMA,EDMA,环己醇,十二醇和 AIBN 加到 50 mL 的锥形瓶中,混合均匀,加入固体致孔剂碳酸钙.将锥形瓶封口,超声混合均

* 2002-10-15 收稿,2002-12-05 修稿;国家自然科学基金资助项目(基金号 20276051);** 通讯联系人

匀,在 40℃ 超级恒温水浴振荡 24 h 进行预聚.在装有搅拌器,回流冷凝管和温度计的三口瓶中,加入分散剂,将反应混合物加入,在氮气保护下,调节搅拌在 400 r/min 左右,在 55℃ 下待液滴分散成适当粒度后,以 3 K/min 的速度升温至 65℃,反应 3 h,然后迅速升温至 85℃,反应 2 h,结束反应.

微孔介质(B)的制备过程,除了无固体致孔剂以外,其余条件与介质 A 相同.

1.2.2 致孔剂的脱除 将聚合物微球转入 400 目尼龙袋中,在沙氏提取器中利用乙醇抽提 24 h,以除去聚合物中残存的有机致孔剂和其它可溶性组分.分离介质 B 凉干后过筛,真空干燥后备用.抽提后的介质 A 浸泡在 0.2 mol·L⁻¹ 盐酸溶液中,直至无气体产生,表明碳酸钙脱除完全,经抽提后,分别利用蒸馏水和乙醇清洗,凉干后过筛,真空干燥后备用.

1.2.3 功能基化反应 将一定粒径的聚合物颗粒在 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 为 7.6)中湿润后,用二乙胺进行化学修饰,具体操作如下:5.0 g 聚合物颗粒与 25 mL 二氧六环和 25 mL 二乙胺混合,于 60℃ 下反应 6.5 h.清洗和抽滤固体颗粒,将聚合物颗粒置于 100 mL NaBH₄ (0.1 mol·L⁻¹) 溶液中,室温震荡 12 h,以使介质骨架上残余的环氧基充分还原为羟基.待反应结束后,倾去上层液体及悬浮颗粒,用蒸馏水充分洗涤.然后用 G3 玻璃砂漏斗抽滤,蒸馏水洗涤至中性后,改用无水乙醇洗涤.功能基化后的离子交换介质真空干燥后备用.

1.3 介质理化性质的表征

粒径分布测定利用 Malvern mastersizer 2000 粒度分析仪(英国 Malvern instrument ltd.)测定;孔径分布利用 Poremaster 压汞孔径分析仪(美国 Quantachrome 公司)测定.比表面积采用 BET 法测定;介质含水量的测定方法同常规.

1.4 静态吸附容量

利用标准间歇式吸附操作测定阴离子交换剂对 BSA 的静态吸附等温线.将干燥的分离介质颗粒放入锥形瓶中,加入 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 为 7.6)溶液,室温下,水浴震荡 12 h. G3 玻璃砂漏斗抽滤,称取湿介质 0.05 g 置于 25 mL 锥形瓶中,加入 5 mL 配好的 BSA 溶液,25℃ 恒温水浴 120 r·min⁻¹ 震荡 24 h 后,取上清液测其在 280 nm 处的吸光度,根据标准曲线和物料衡算计算介质的吸附量.在探讨介质合成配比时,初始 BSA 溶液浓度均为 1 mg·mL⁻¹.

1.5 色谱实验

将介质颗粒用乙醇制成匀浆液,采用重力沉降法装入层析柱中(50 mm × 5 mm I.D.). 然后将其连接到 AKTA FPLC 柱层析系统(瑞典安法玛西亚公司).以 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl(pH 为 7.6)为流动相,以测定流速与背压的关系.

动态吸附容量的测定采用迎头分析法.利用 2 mg·mL⁻¹ BSA 的 Tris-HCl 溶液测定其穿透曲线,根据下式计算层析柱的动态吸附容量.

$$q_{10} = \frac{cF(t_{10} - t_0)}{V_B} \quad (1)$$

其中 q_{10} 为达到 10% 穿透时的动态吸附容量 mg·mL⁻¹ (Bed column), c 为入口 BSA 料液浓度 mg·mL⁻¹, F 为 BSA 体积流速 mL·min⁻¹, t_{10} 为出口浓度达到进口浓度 10% 的时间 min, t_0 为死时间 min, V_B 为柱体积 mL.

2 结果和讨论

2.1 介质制备过程的优化

2.1.1 分散剂的影响 分别采用了不同浓度的聚乙烯醇(PVA)和明胶作为分散剂,研究了不同分散剂浓度和种类下得到的介质的粒径分布进行了分析,结果如表 1 所示.

Table 1 Effects of dispersing agent and its concentration on the mean particle size of the biporous beads

Dispersing agents	1% PVA	2% PVA	2.5% PVA	0.1% Gelatin	0.1% Gelatin + 2% PVA
Mean particle sizes (μm)	87	47	20	108	51

由表 1 可知,以 1% PVA 或 0.1% 明胶作分散剂时,得到的介质平均粒径较大,不适用于中高压层析,而以 2.5% PVA 作分散剂所产生的介质粒径过小,2% PVA 作分散剂时,介质的粒径分布适中.但在实验中发现,只用 PVA 作分散剂,固体

致孔剂 CaCO₃ 在反应过程中易从球形介质中泄漏出来.这是因为 PVA 水溶液的表面张力较小,易形成疏松型介质.又考虑到明胶在水溶液中的表面张力和保胶能力较大,将形成紧密型介质^[9],故采用 2% PVA 和 0.1% 明胶的混合液为分散剂,

既可得到粒径较小($51\ \mu\text{m}$)而又包容较多 CaCO_3 粒子的紧密型的球形介质。

2.1.2 有机致孔剂的影响 有机致孔剂用量直接影响聚合过程中聚合物发生相分离的时间。本研究测定了在相同条件下,不同有机致孔剂用量对介质 A 吸附性能的影响,结果如图 1 所示。图中, M_1 为有机致孔剂(环己醇 + 十二醇)与单体(GMA)的摩尔比。由图可见,过多或过少的有机致孔剂均不能得到吸附性能较好的吸附剂。致孔剂用量少时,介质的机械强度好,但吸附量低;致孔剂用量多时,介质吸附量高,但会造成介质内部结构的疏松,导致机械强度下降,并且不能很好的保证孔结构的完整性。同时在选择用于蛋白质吸附分离介质时,必须兼顾机械强度和吸附容量这两个重要因素。因此,在本实验范围内较佳的 M_1 值范围为 2~3.5, M_1 取 2.6 时可得到介质 A 对蛋白的最佳吸附量。

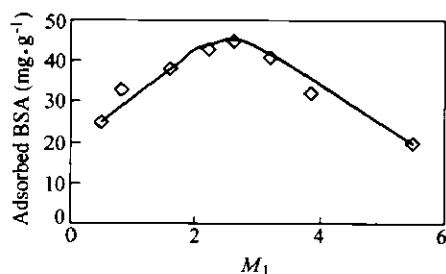


Fig. 1 Effect of the amount of porogenic solvent on BSA adsorption to matrix A preparation
 M_1 : molar ratio of porogenic agent to GMA

2.1.3 固体致孔剂用量的确定 考察了固体致孔剂(超细碳酸钙颗粒)用量对介质 A 吸附性能和含水量的影响,结果示于图 2。其中 M_2 为碳酸钙与液相反应体系(GMA + EDMA + 有机致孔剂)的体积比。可以看出,随着碳酸钙加入量的增加,介质 A 的含水量有所增加,而其对 BSA 的吸附量却明显下降,特别是当 M_2 大于 0.43 时。这表明碳酸钙固体颗粒的加入使介质内部大孔比例增加,大孔结构的存在使得介质在湿润状态下含水量提高。然而 M_2 的增大,有机致孔剂的含量相对降低,而有机致孔剂是介质比表面积的主要贡献者,其含量降低,介质比表面积降低,其对 BSA 的静态吸附量降低。同时 M_2 大于 0.3 时,聚合反应过程中固液悬浮体系呈粘稠的半流动状态,得到的聚合物粒子的粒径较大($100\ \mu\text{m}$ 以上)。综

合考虑含水量,吸附量和粒径因素,本研究确定 M_2 为 0.2 为宜。

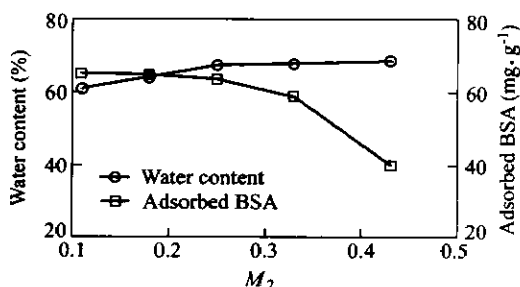


Fig. 2 Effect of the amount of solid porogenic CaCO_3 on matrix A preparation
 M_2 : volume ratio of CaCO_3 to (GMA + EDMA + organic porogenic agent)

2.1.4 交联剂用量的影响 交联剂用量直接影响合成介质的孔结构和溶胀行为,进而对吸附性能产生重要影响。在保持致孔剂用量不变的情况下,改变交联剂用量制备了不同的介质,其对 BSA 的吸附结果如图 3 所示,图中 M_3 为交联剂(EDMA)与单体(GMA)的摩尔比。由图可见,介质对 BSA 的吸附量随交联剂用量的增加而减小。这是因为交联剂用量的增加使介质的孔径减小,介质内部结构更加紧密,对 BSA 的排阻作用增大,导致吸附量下降。但当 M_3 在 1.0 以下时,吸附量的变化并不显著。考虑到交联剂用量的增加使得介质内部分子链交缠机会增加,介质机械强度增强,因此,本研究确定 M_3 的较佳值为 1.0。

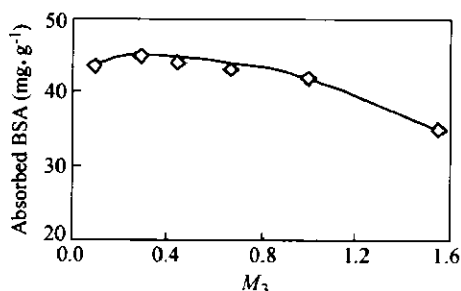
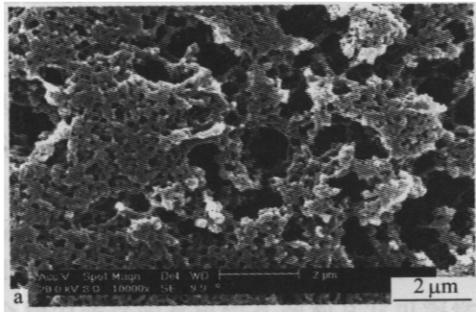


Fig. 3 Effect of the amount of cross-linking on BSA adsorption to matrix A
 M_3 : molar ratio of EDMA to GMA

2.2 两种介质性能的比较

本研究在采用固液联合致孔方式成功合成了双孔球形介质 A 后,又采用悬浮聚合方法合成了只含液体致孔剂的微孔球形介质 B,并比较了介质 A 和 B 的性能。

2.2.1 孔结构和物理性能的比较 图 4 为双孔介质 A 和微孔介质 B 表面的扫描电镜照片.从中可以清楚的看到介质 A 表面既分布有致密的



微孔,又分布有明显的超大孔(为 CaCO₃ 所致),具典型的双孔结构;而介质 B 表面则只分布有大量致密的微孔.

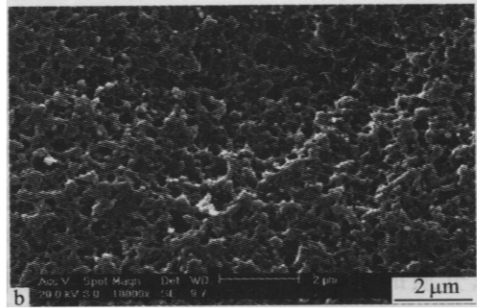


Fig. 4 Scanning electron micrographs of the matrices

图 5 为两种介质的孔体积分布图.目前常见的多孔型液相色谱填料中,孔径大于 150 nm 的孔称为超大孔,其中 600 ~ 800 nm 的孔为贯穿性大孔^[10].按此划分,介质 A 的超大孔(> 180 nm)体积占总孔体积的 37.9%,贯穿性孔的体积占总孔体积的 12.6%;而介质 B 的超大孔仅占其孔总体积的 13.2%,介质 B 的孔主要分布 4 ~ 180 nm 的孔区,其孔体积占总孔体积的 86.8%.

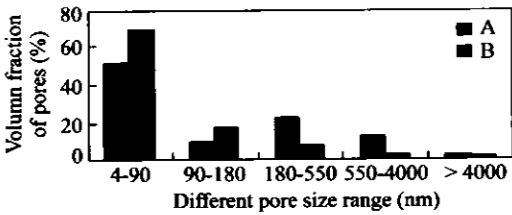


Fig. 5 Volume fraction of pores with different size ranges

表 2 列出了两种介质的粒径、含水量和比表面积等物性的比较结果.由表 2 可见,两介质的平均粒径相近,介质 A 的比表面积小于介质 B,而其含水量大于 B,这表明大孔结构的存在使双孔介质在湿润状态下的含水量较大.

Table 2 Physical properties of the two matrices

Matrix	Particle sizes (μm)	Specific area (m ² ·g ⁻¹)	Water content (%)
A	50.6	91.3	67.1
B	47.9	137.8	60.5

2.2.2 静态吸附性能 两种介质对 BSA 静态吸附等温线如图 6 所示.可以看出,Langmuir 吸附等温方程可以较好地拟合介质 A 和 B 对 BSA 的静态吸附行为.

$$q = \frac{q_m c}{K_d + c}$$

(2)

其中, q 为平衡吸附量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), q_m 为饱和吸附量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), c 为水相中蛋白质的平衡浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), K_d 为吸附平衡解离常数($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).另外,A 和 B 两介质均具有较高的静态吸附容量,其饱和吸附容量分别为 $90.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $96.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (湿重),高于双孔型不定型介质和其他文献结果^[7,8].介质 B 的静态吸附容量略高于介质 A,主要是其微孔含量较高,比表面积值较大.

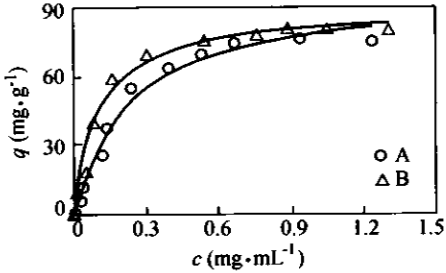


Fig. 6 Static adsorption isotherms of BSA to the anion-exchange media

2.2.3 色谱性能 动态吸附容量和静态吸附容量的差别可以作为鉴定分离介质传质性能的标志^[11].图 7 中显示了在 $25 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速下, $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ BSA 溶液在装填有介质 A 和 B 的柱中的穿透曲线.按入口浓度 10% 计算,介质 A 的动态吸附容量为 $32.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Bed volume),相当于 $51.6 \text{ mg} \cdot \text{g}$ (Wet resin),即介质 A 的动态吸附容量为其静态吸附量的 57%;而介质 B 的动态吸附容量仅为 $7.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Bed volume),相当于 $11.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (Wet resin),即为其静态吸附容量的 12%.这是由于介质 A 内部大孔结构的存在使 BSA 分子可以以对流方式进入介质内部,强化了传质过程.这一结果与利用灌注层析介质所得结果

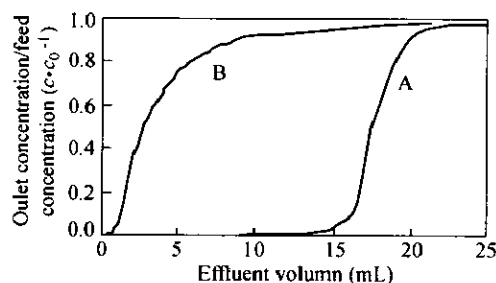
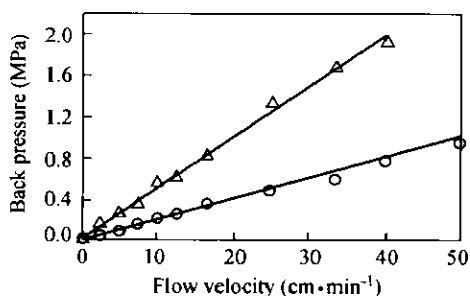
Fig. 7 Breakthrough curves of BSA at $25 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ 

Fig. 8 Effect of liquid flow rate on back-pressure of the columns

○ matrix A, △ matrix B

一致^[5]。

在 $2.5 \sim 50 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速范围内测定了两种介质的色谱流动性能 (图 8)。由图可见, 两种介质的流速和背压的关系在中高压范围内均表现为很好的线性关系, 说明两种介质都具有良好的机械强度。介质 A 在高流速下 ($50 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$) 的背压只有 1 MPa 左右, 而介质 B 在 $40 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速下背压已达 2.0 MPa。该结果证明介质 A 的双孔结构减小了流动阻力, 降低了色谱柱的操作背压。

综上所述, 本文采用新型固液联合致孔模式和悬浮聚合方法, 成功制备了具有双孔结构的色谱介质。用二乙胺修饰后, 得到具有较高吸附量的双孔球形阴离子交换剂。研究表明分散剂种类和

浓度、有机致孔剂、固体致孔剂和交联剂的用量对双孔介质的形成和性能均具有明显的影响, 确定了合成双孔介质较佳的配比。

介质 A 内部存在 $> 180 \text{ nm}$ 的大孔区, 占孔体积的 37.9%, 而介质 B 内的孔主要集中在 $4 \sim 180 \text{ nm}$ 的小孔区, 占孔体积的 86.8%。介质 A 和 B 对 BSA 静态吸附均符合 Langmuir 吸附等温方程, 且皆具有较高静态吸附容量和较好的机械性能。介质 A 的流动性能优于介质 B, 并且介质 A 的动态吸附容量远高于介质 B 的动态吸附容量, 表明该双孔介质可用于高速色谱分离过程。

REFERENCES

- 1 Zhao Zhongzhang(赵中璋), Yang Shuming(杨树明), Yang Yanguo(杨彦果), Tian Xiulan(田秀兰), Su TianSheng(苏天升). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 1999, (1): 31 ~ 36
- 2 Fernandez M A, Laughingouse W S, Carta G J. Chromatogr A, 1996, 746: 185 ~ 198
- 3 Feng Shaohua(鄢韶华), Liu Zheng(刘铮), Ding Fuxin(丁富新), Yuan Naijiu(袁乃驹). Journal of Chemical Industry and Engineering(China)(化工学报), 2001, 52(9): 782 ~ 787
- 4 Van krevelde M E, Van den H N. J Chromatogr, 1987, 397: 25 ~ 30
- 5 Afeyan N B, Gordon N F, Mazsaroff I, Varady L, Fulton S P. J Chromatogr, 1990, 519: 1 ~ 29
- 6 Lyoyd L L. J Chromatogr, 1991, 544: 201 ~ 208
- 7 Shi Yang(施扬), Bai Shu(白姝), Sun Yan(孙彦). Ion Exchange and Adsorption(离子交换与吸附), 2002, 18(2): 8 ~ 16
- 8 Zhang Minlian(张敏莲), Bai Shu(白姝), Sun Yan(孙彦). Ion Exchange and Adsorption(离子交换与吸附), 2000, 16(3): 199 ~ 206
- 9 Pan Zuren(潘祖仁). Chemistry of Polymer(高分子化学). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2000. 109
- 10 Liu Guoquan(刘国詮), Yu Zhaolou(余兆楼). The Technology of Chromatography Column(色谱柱技术). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2001. 261 ~ 262
- 11 Deen W M. AIChE J, 1987, 33: 1409 ~ 1425

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL BIPOROUS SPHERICAL ION-EXCHANGER FOR PROTEIN ADSORPTION

WU lei, GAN Yiru, SUN Yan

(*Department of Biochemical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology,
Tianjin University, Tianjin 300072*)

Abstract A novel biporous spherical matrix of poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) was prepared by suspension polymerization with superfine granules of calcium carbonate as solid porogenic agent and cyclohexanol plus dodecanol as solvent porogenic agents. After being functionalized with diethylamine, the matrix (denoted as matrix A) was used as an anion exchanger for protein adsorption. The types and concentration of dispersing agents, the amount of calcium carbonate and solvent porogenic agents, as well as cross-linking agents for the preparation of the matrix had been optimized. It was found that in matrix A the macropores (> 180 nm) took 37.9% of all the pore volume, while in the beads (matrix B) prepared with only solvent porogenic agents 86.8% of the pore volume was in the range 4 ~ 180 nm. Due to the presence of the macropores, convective flow occurred through matrix A in chromatography, leading to a high dynamic capacity up to $51.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (wet resin) at a flow rate as high as $25 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$, nearly 4 times higher than that of matrix B. Moreover, the column of matrix A showed much lower backpressure than that of matrix B. These results indicated the potential application of the biporous matrix in high-speed chromatography for protein separation.

Key words Biporous, Matrices, Suspension polymerization, Ion-exchanger, Adsorption, Bovine serum albumin