

## 正离子型疏水改性聚氧乙烯单成相组分双水相系统的相行为\*

邓 刚 姚善涇\*\* 林东强

(浙江大学化学工程与生物工程学系 杭州 310027)

**摘 要** 对正离子型疏水改性聚氧乙烯(HM-EO)单成相组分双水相系统的相行为进行了考察,并分析其电荷特性. HM-EO在水溶液中呈现两亲性,可以形成胶束,进而形成带电的胶束簇集体. 通过改变溶液的 pH 值、盐浓度及添加带相反电荷的表面活性剂 SDS,可改变胶束簇集体的带电状态,从而影响系统的相行为. 增大 pH 值,有利于系统的分相. 盐的添加也可以增大双水相两相区域,正离子影响次序为  $K^+ > Na^+$ ,负离子次序为  $SO_4^{2-} > F^- > Cl^- > Br^- > I^-$ . 进一步考察了 HM-EO 和 SDS 之间的相互作用,结果表明 SDS 能与 HM-EO 形成混合胶束簇集体,改变 HM-EO 双水相系统的带电特性.

**关键词** 双水相系统, 疏水改性聚氧乙烯, 静电相互作用, 胶束簇集体

双水相分配技术由于其分配环境温和、生物相容性好等优点,近 20 年来,已被广泛用于各种生物对象的分离纯化<sup>[1]</sup>. 为了进一步改善双水相分配的选择性,提高分配效率,同时减少成相聚合物的用量,加强聚合物的回收利用,新型双水相系统的开发一直是研究的热点<sup>[2]</sup>. Jonsson 等<sup>[3]</sup>将一种疏水改性聚氧乙烯(hydrophobically modified ethylene oxide polymer,简称 HM-EO)用作成相剂,对聚合物水溶液的浊点温度及模型蛋白的分配作了初步研究,发现该新型双水相分配的主要推动力来自于静电相互作用.

由于 HM-EO 聚合物的水溶液在较低温度下就可以形成两相系统,且两相的水含量均高达 80% 以上,因此可以称之为单成相组分双水相系统,有别于常规使用的聚合物/聚合物和聚合物/无机盐双水相系统. 为了深入了解这类体系的特点和对蛋白质的分配性能,研究这类体系的相平衡是非常重要的. Thuresson 等<sup>[4]</sup>研究了 HM-EO 分子量约为 25 kD 的若干情况,一般情况下,聚合物分子量的增大将会降低体系的浊点温度,有利于蛋白质等生物活性物质的分配. 因此,本文将选择重均分子量约为 55.8 kD 的 HM-EO,系统考察不同因素(如 pH 值、无机盐浓度、盐离子种类和表面活性剂等)对该聚合物形成相图的影响,并对成相机理进行相关的分析和讨论.

## 1 实验部分

### 1.1 材料

疏水改性聚氧乙烯嵌段聚合物 HM-EO 购自 Akzo Nobel 公司(瑞典),重均分子量约为 55.8 kD,多分散性系数为 1.34. 对 HM-EO 进行适当的预处理,加入适量的去离子水,静置分相,取下相;加入去离子水,再分相;重复 10 次,冷冻干燥至恒重. 十二烷基硫酸钠(SDS)购自 Fluka 公司(瑞士). 其它试剂均为市售分析纯.

### 1.2 双水相系统

用不同 pH 值的巴比妥缓冲液溶解 HM-EO,配制浓度为 5 wt% 的母液. 取一定量的母液,加入适量的缓冲液,制备不同 HM-EO 浓度的双水相系统,总质量为 5 g. 恒温静置分相,上下相分别取样,分光光度法测定 HM-EO 含量.

### 1.3 分析方法

HM-EO 质量百分浓度测定,准确称量待测样品的质量,加入等量的丙酮,用丙酮:去离子水 1:1(质量比)的溶液稀释到一定浓度范围,取稀释液 0.5 g,加入 5 mL 考马斯亮兰 G250 显色剂<sup>[5]</sup>,显色 30 min,620 nm 处测定吸光值,由标准曲线获得 HM-EO 的浓度.

SDS 的测定参见文献[3].

\* 2005-02-20 收稿,2005-04-23 修稿;国家自然科学基金(基金号 20276065;20576118)资助项目;

\*\* 通讯联系人, E-mail: yaosj@che.zju.edu.cn

## 2 结果与讨论

### 2.1 HM-EO 的化学结构

HM-EO 的化学结构式如图 1(a)所示,包含聚氧乙烯骨架、表面活性基团(带有十二烷基的叔胺)

基团)和桥联基团(IPDI).分析 HM-EO 的分子结构表明, HM-EO 在水溶液中会形成带电荷的胶束簇集体,包括分子内缔合簇集体和分子间缔合簇集体<sup>[6,7]</sup>,如图 1(b)所示.

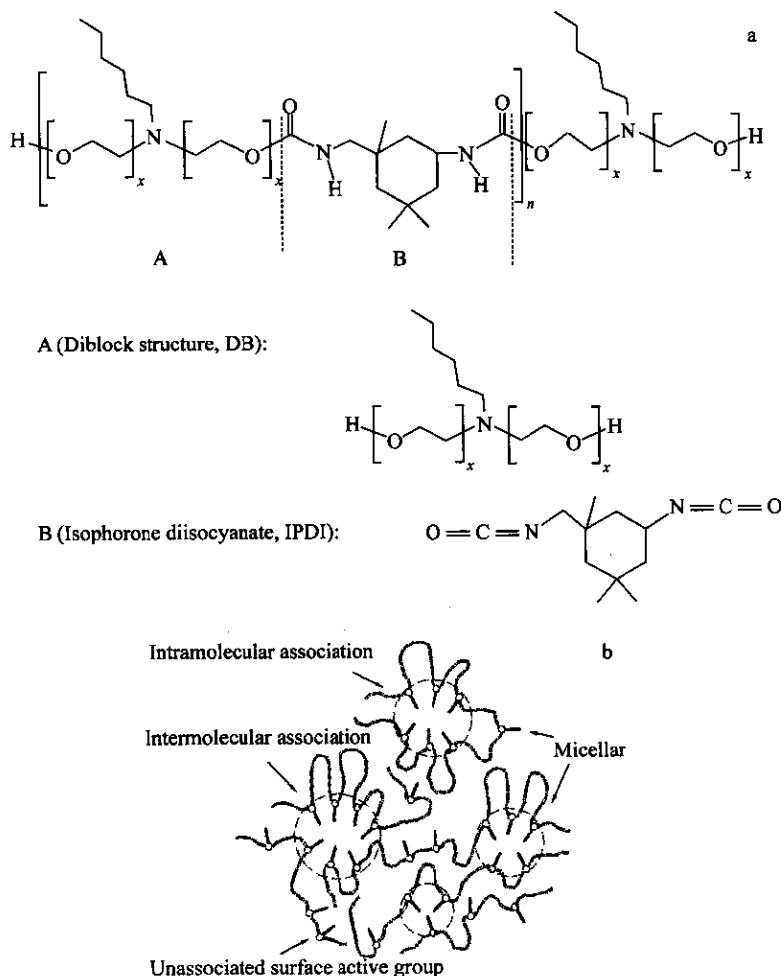


Fig. 1 The chemical structure of HM-EO and the network of charged micellar aggregates ( $x = 74, n = 7$ )

a) The chemical structure of HM-EO; b) The network of charged micellar aggregates

### 2.2 pH 对 HM-EO/缓冲盐双水相系统相行为的影响

采用巴比妥缓冲液调节溶液 pH, 配制 HM-EO/缓冲盐双水相系统, 考察 pH 对系统相图的影响. HM-EO/缓冲盐双水相系统中所含的盐类物质与传统的聚合物/无机盐双水相系统(如聚乙二醇/磷酸钾)中无机盐的作用有本质区别, 它不是成相的必需组分, 仅起到调节体系的 pH 值和离子强度的作用. 图 2 给出了相同电导率条件下, 不同 pH 值的 HM-EO/缓冲盐双水相系统相图的变化. 随着 pH 值降低, 体系的两相区域(即不同温度时上下相浓度曲线之间的区域)逐渐变小. 分析可能原因如下, 由于 pH 值较高时( $\text{pH} > 11$ ), HM-EO 的

表面活性基团不带电<sup>[3]</sup>; 随着 pH 值的降低, HM-EO 分子中叔胺基团与水的离解反应加剧, 胶束空间网状结构的电荷密度升高, 胶束间的静电作用变大, HM-EO 分子变得更加伸展, 分子间距离变大, 体系朝着不利于分相的方向发展. 由于本文所用 HM-EO 的分子量较高, 体系的浊点温度较低, 使得 HM-EO/缓冲盐系统在常温或低温下均能分相. 从图 2 还可以看出, 上相的 HM-EO 浓度小于 1.0%, 下相的 HM-EO 浓度在 5% ~ 25% 之间, 因此两相的水含量相当高, 可以称之为双水相系统, 高水含量的体系将有利于保持生物物质的活性.

### 2.3 无机盐浓度对相图的影响

虽然盐不是作为一种成相剂出现在 HM-EO

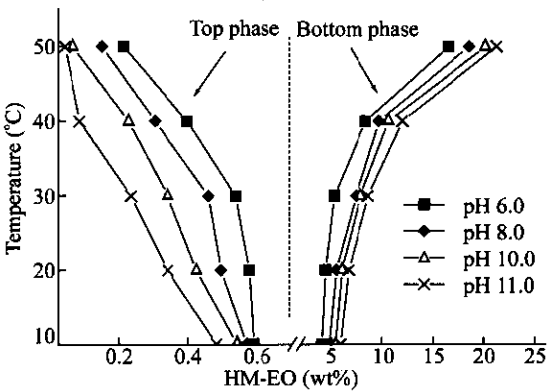


Fig.2 Phase diagram of HM-EO/buffer systems at different pH  
The initial concentration of HM-EO was 2.5 wt% ;The conductivity of barbiturate buffers at 25℃ was 3 mS/cm.

双水相系统中,但是由于双水相系统将主要处理生物活性物质,将会涉及到缓冲液或添加盐,因此体系中必然会存在一定浓度的无机盐,盐浓度有可能会对相行为产生影响.为此,考察了不同NaCl浓度对 HM-EO 双水相系统相平衡的影响,结果如图 3 所示.由图可知,随着 NaCl 浓度的增大, HM-EO 双水相两相区域逐渐增大,说明盐浓度的增大有利于双水相的形成.分析原因在于电解质的加入会使带电胶束表面的双电层收缩,一方面减少了表面活性基团离子端间的排斥作用,从而使得更多的表面活性基团进入胶束中,而体系的自由能却不致增加;另一方面,虽然胶束聚集数(即缔合成胶束的表面活性基团的个数)增加,但是胶束之间的静电作用由于双电层收缩而变弱,胶束空间网状结构收缩,体系朝着利于分相的方向发展.

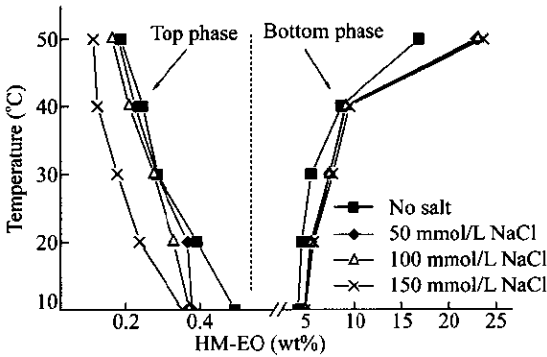


Fig.3 Effect of NaCl concentration on phase diagram of HM-EO aqueous two-phase systems  
The initial concentration of HM-EO was 2.5 wt% .

2.4 盐离子种类对相图的影响

由于盐离子种类对生物物质的活性和分配都

有一定的影响,因而了解不同盐离子种类对新型 HM-EO 双水相系统相行为的影响,对其具体应用具有一定的指导意义.首先考察了最常用的正离子( $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$ )的氯化盐和溴化盐,相图如图 4 所示.结果显示,两种正离子对分相的影响区别不明显, $\text{K}^+$  在增加 HM-EO 双水相两相区域的效果上略高于  $\text{Na}^+$ .图 5 显示了在相同离子浓度下不同负离子对相图的影响,增大 HM-EO 双水相两相区域的次序为  $\text{SO}_4^{2-} > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ .盐离子的影响主要是由于不同盐离子的亲水性差异造成的,不同种类的盐离子在上下相的分配比往往不同,从而引起上下两相的盐浓度差别,影响下相中带电胶束簇集体所构成的空间网状结构的电荷密度变化.

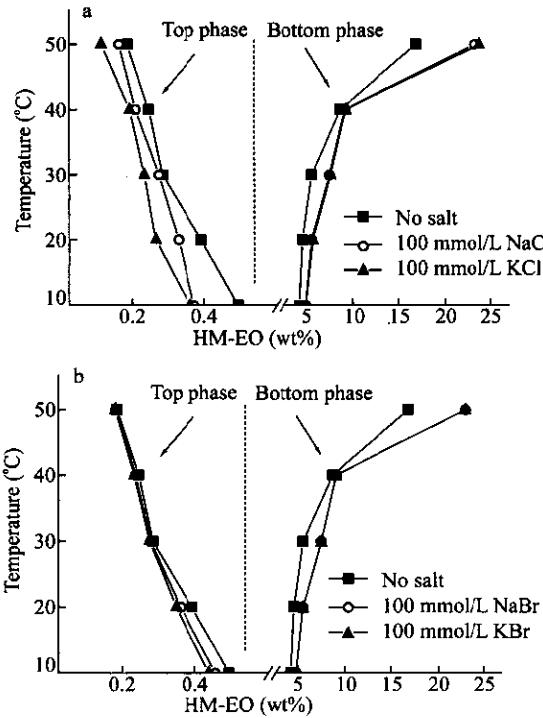


Fig.4 Effect of different cations on phase diagram of HM-EO aqueous two-phase systems

The initial concentration of HM-EO was 2.5 wt% .

a) Chlorides; b) Bromides.

2.5 SDS 对相图的影响

由于 HM-EO 分子中表面活性基团的疏水基和负离子表面活性剂 SDS 的疏水基同为十二烷基,因而在 HM-EO 水溶液中加入一定量的 SDS,可形成具有更强带电性能的混合胶束,从而使得下相中带电胶束簇集体构成的空间网状结构具有更高的电荷密度,上下相的电势差变大,增加该新

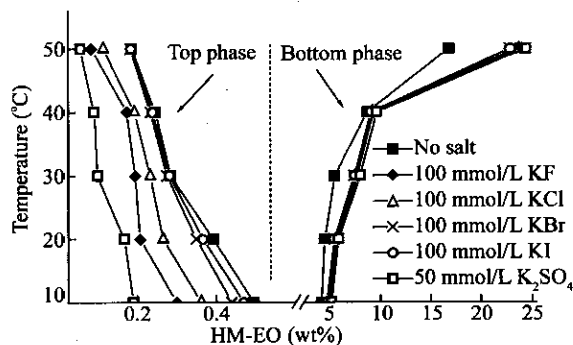


Fig. 5 Effect of different anions on phase diagram of HM-EO aqueous two-phase systems

The initial concentration of HM-EO was 2.5 wt%.

型双水相用于蛋白质分配的潜在能力.然而,加入 SDS 将影响 HM-EO 双水相系统的相图,结果如图 6 所示.

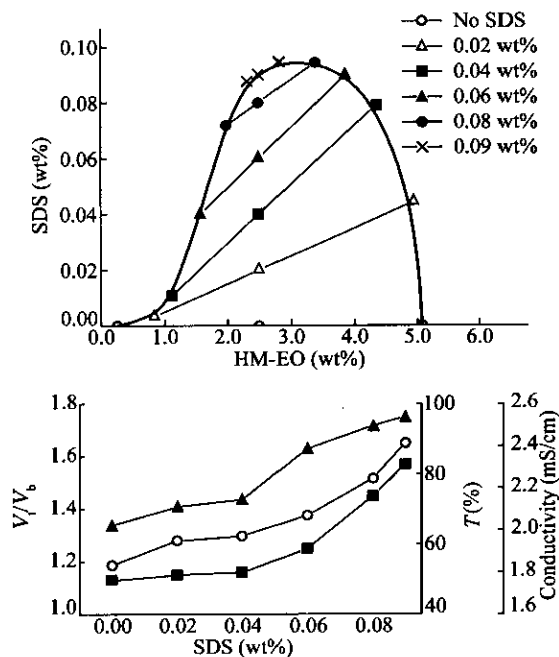


Fig. 6 Phase behavior of HM-EO/SDS systems

The initial concentration of HM-EO was 2.5 wt%. The pH and conductivity at 25°C of barbiturate buffers were 9.0 and 3 mS/cm, respectively. The temperature was 20°C.

a) Phase diagram; b) Effect of SDS on ATPS

—■— Ratio of top phase volume ( $V_1$ ) to bottom phase volume ( $V_2$ );  
—○— Transmittance of bottom phase; —▲— Conductivity of top phase

图 6(a)表明, SDS 在体系中主要分配在下相, 随着 SDS 浓度的增加, SDS 和 HM-EO 在上下两相的浓度差逐渐减小, 当 SDS 浓度达到足够高时 (0.1 wt%), 下相的胶束簇集体网络结构解体, 上下相的界面消失而成为均相体系. 从图 6(b)可见, SDS 浓度在 0 wt% ~ 0.04 wt% 范围内, 体系的相比 (双水相系统上下相的体积之比)、上相的电导率和下相的透光率均变化比较平缓, 说明这一阶段 SDS 分子能与 HM-EO 中的表面活性基团构成较稳定的混合胶束, 胶束簇集体形成的空间网状结构的构象变化不大<sup>[8]</sup>. 当 SDS 浓度超过 0.04 wt% 时, 下相的空间网状结构由于过度的伸展开始部分瓦解, 一些聚合物分子开始从网状结构中游离出来, 下相的透光率显著增加, 同时上相的聚合物浓度开始增加. 当 SDS 浓度超过临界胶束浓度时, 下相的胶束簇集体网络结构彻底解体, 形成均一的游离胶束, 使上相的 SDS 浓度与下相接近, 上相中不参与胶束形成的 SDS 分子数也相应增加, 从而使得上相的电导率上升.

综上所述, HM-EO 在水溶液中呈现两性性, 可以形成胶束, 进而形成带电胶束簇集体, 并构成空间网状结构. 由于存在叔胺基团的水解, 使得所形成的胶束簇集体在适合的 pH 条件下带正电荷, 通过改变溶液的 pH 值、盐浓度以及添加带相反电荷的表面活性剂, 均可调节胶束簇集体的带电性.

HM-EO 分子量较大, 水溶液的浊点温度较低, HM-EO 水溶液在常温下可形成一种新型的单相组分双水相系统, 增大了蛋白质分配的可操作性. HM-EO 双水相系统中, 由于聚合物分子中疏水基团的分子间或分子内的缔合作用, 能够形成胶束, 胶束之间由聚氧乙烯链相连, 并存在静电相互作用, pH 值、盐浓度和离子类型均对系统相图有影响. 水溶液中 SDS 分子可以与 HM-EO 的表面活性基团形成更加稳定的混合胶束, SDS 浓度对带电胶束簇集体构成的空间网状结构的影响显著, 因此 SDS 的添加应该控制在一定范围内, 保证下相的空间网状结构带电性能良好. 该新型双水相系统用于蛋白质分配方面的研究正在进行中.

## REFERENCES

- 1 Silva M E, Franco T T. *Brazil Journal of Chemical Engineering*, 2000, 17: 1 ~ 17
- 2 Johansson H O, Persson J, Tjerneld F. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 66: 247 ~ 257
- 3 Jonsson M, Johansson H O. *Journal of Chromatography A*, 2003, 983: 133 ~ 134
- 4 Thuresson K, Karlson L, Lindman B. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002, 201: 9 ~ 15
- 5 李建武 (Li Jianwu). *The Principles and Methods of Biochemical Experiments (生物化学实验原理和方法)*. Beijing (北京): Beijing University Press (北京大学出版社), 1994. 174 ~ 175
- 6 Tanaka F, Koga T. *Computational and Theoretical Polymer Science*, 2000, 10: 259 ~ 267
- 7 Alami E, Almgren M, Brown W. *Macromolecules*, 1996, 29: 2229 ~ 2243
- 8 Guillemet F, Piculell L. *The Journal of Physical Chemistry*, 1995, 99: 9201 ~ 9209

## PHASE BEHAVIOR OF AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS WITH ONE PHASE-FORMING COMPOSITION OF CATIONIC HYDROPHOBICALLY MODIFIED ETHYLENE OXIDE POLYMER

DENG Gang, YAO Shanjing, LIN Dongqiang

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

**Abstract** A cationic hydrophobically modified ethylene oxide polymer (HM-EO) was used to form aqueous two-phase system with only one phase-forming composition. It was found that the phase separation could be achieved under room temperature. The phase behavior and charge properties of HM-EO aqueous two-phase systems were studied systematically. The amphiphilic property of HM-EO molecule resulted in the micellization and aggregation of micelles in water. The micellar aggregates formed in the bottom phase could be charged, and the net-charge could be adjusted by the pH and conductivity of bulk solution and adding sodium dodecyl sulfate (SDS). The increase of pH would improve the phase separation of HM-EO aqueous two-phase system. The effect of salts on the phase behavior was observed. The influence of cations varied as  $K^+ > Na^+$ , and that of anions as  $SO_4^{2-} > F^- > Cl^- > Br^- > I^-$ . In addition, the interaction between HM-EO polymer and anion surfactant SDS was studied. The results indicated that the addition of SDS caused the formation of mixed micellar aggregates of SDS and HM-EO which changed significantly the charge property of HM-EO aqueous two-phase systems.

**Key words** Aqueous two-phase system, Hydrophobically modified ethylene oxide polymer, Electrostatic interaction, Micellar aggregates