

亲水性含环氧基磁性聚合物微球的制备与性能表征*

薛 屏** 刘海峰

(宁夏大学能源化工自治区重点实验室 银川 750021)

摘 要 选择甲酰胺作磁性 Fe_3O_4 微晶的分散剂,通过设计反相悬浮聚合体系,合成了粒径分布窄、球状亲水性含环氧基磁性聚合物(MGM)。利用扫描电子显微镜(SEM)、红外光谱(FT-IR)、X射线粉末衍射仪(XRD)、振动样品磁强计(VSM)和低温 N_2 吸附以及化学分析方法对聚合物进行了性能表征。结果表明,合成的 MGM 呈球形,且粒度分布较窄,粒径为 0.13~0.28 μm 的粒子占 91%。甲酰胺分散 Fe_3O_4 微晶表面的亲水性进一步增强,单体甲基丙烯酸缩水甘油酯和 N,N' -亚甲基双丙烯酰胺交联共聚生成的胶粒能够包埋 Fe_3O_4 微晶形成胶核,胶核聚集成均匀、稳定的 MGM 微球。MGM 中 Fe_3O_4 含量为 6.17% 时,比饱和磁化强度 σ_s 达 6.5 emu/g ; 其比表面积、平均孔径和孔容分别为 117.6 m^2/g , 15.6 nm 和 0.46 cm^3/g , 表面环氧基团含量为 0.53 mmol/g 。MGM 借助自身的活性环氧基团在十分温和的条件下共价偶联青霉素酰化酶(penicillin G acylase EC 3.5.1.11, 简称 PGA),制备的固定化酶在 37 $^\circ\text{C}$ 下催化水解青霉素 G 钾生成 6-氨基青霉烷酸(6-APA)的表观活性达 502 IU/g,并且在使用过程中没有出现磁聚集现象。

关键词 亲水性磁性聚合物, 环氧基, 反相悬浮聚合, 青霉素酰化酶, 固定化

近些年来,磁性高分子复合材料越来越引起人们的重视。由于其不仅具有磁性,易于导向运动和从体系中快速分离,而且表面含有反应性功能基团,能够结合生物活性分子,因而在固定化酶^[1]、细胞分离^[2]、靶向药物^[3]等方面有着广泛的应用前景。

合成磁性高分子材料的关键在于如何使无机磁性物质和有机单体间有较好的亲和性。对无机磁性材料表面进行改性,增强其与有机单体间的亲和作用,有利于制备球状、性质均一的高分子功能材料。章永化^[4]等将 Fe_3O_4 纳米粒子经油酸表面改性后,分散于苯乙烯中,用本体聚合法制得疏水性聚苯乙烯纳米磁性材料。谢钢^[5]等分别采用 3 种表面活性剂 Disperbyk-106、Disperbyk-108 和 Disperbyk-111 对 Fe_3O_4 进行表面处理,用细乳液聚合法制得平均粒径为 340 nm 的 PS/ Fe_3O_4 磁性复合微球。Gu^[6]等用硅烷偶联剂对 Fe_3O_4 表面进行了改性,经无皂乳液聚合得到以聚苯乙烯为核的磁性乳胶粒。但目前对于亲水性环氧基磁性聚合物微球的制备仍缺乏报道,而这类复合材料在生物活性物质的固定化和分离方面有重要应用。

本文以甲基丙烯酸缩水甘油酯为功能性单体, N,N' -亚甲基双丙烯酰胺作交联剂,甲酰胺分散磁性 Fe_3O_4 制备磁流体,采用反相悬浮聚合技术合成了亲水性环氧基磁性聚合物微球,利用 SEM、FT-IR 和 VSM 等手段研究了聚合物的结构性能,考察了磁性聚合物微球对青霉素酰化酶的固定化作用。

1 实验部分

1.1 主要试剂

甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA, AR, Acros), N,N' -亚甲基双丙烯酰胺(MBAA, AR, 天津科密欧化学试剂开发中心),甲酰胺(AR, 天津福晨化学试剂厂), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (AR, 天津福晨化学试剂厂), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (AR, 天津瑞金特化学品有限公司),偶氮二异丁腈(AIBN, AR, 天津科密欧化学试剂开发中心),Span60(CP, 上海润捷化学试剂有限公司),硬脂酸钙(CP, 上海试剂一厂),青霉素 G 钾盐(河北制药厂),青霉素酰化酶(PGA, 478 IU/mL, 浙江顺风海德尔公司),正庚烷(AR, 天津瑞金特化学品有限公司),四氯乙烯(AR, 天津科密欧化学试剂开发中心)。

* 2005-11-15 收稿, 2006-02-22 修稿; 国家自然科学基金(基金号 20564002)资助项目和国家重大基础研究前期研究专项(项目号 2004CCA05900)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: ping@nxu.edu.cn

1.2 磁性 Fe_3O_4 微粒的制备

Fe_3O_4 微晶的制备采用化学共沉淀法^[7]. 将摩尔比 1:2 的 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 200 mL 去离子水中, 搅拌下滴入浓 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 至 pH 值为 8.5. 于 60℃ 下熟化 30 min 后, 黑色悬浮液用去离子水洗至中性. 经抽滤, 干燥, 得到黑色 Fe_3O_4 粉体.

1.3 磁性聚合物微球的制备

在装有温度计、恒速搅拌器、回冷管及导气管的 2 L 四颈瓶中加入 1.1 L 正庚烷与四氯乙烯体积比为 3:1 的混合溶剂, 搅拌下加入 Span60-硬脂酸钙复合表面活性剂, 混合均匀. Fe_3O_4 粉末用甲酰胺分散制备成磁流体, 然后与 65 g 的单体 (GMA 与 MBAA 质量比为 2:3) 混合后转移至四口烧瓶中. 加入 4.5 g AIBN 引发剂, 于 60℃ 在氮气保护下反应 5 h. 反应停止后在磁场中沉降分离出棕色小球. 小球用丙酮洗涤抽提后, 在室温下真空干燥至恒重用.

1.4 磁性聚合物微球的性能表征

聚合物形貌观察采用日本 JEOL JSM-6360LV 扫描电子显微镜. 物相分析采用日本理学 K/MaX-3c X-射线衍射仪, Cu 靶 $\text{K}\alpha$ 射线, 管压 40 kV, 管流 40 mA. BET 比表面积、平均孔径及孔容采用美国 Micromeritics ASAP2010 比表面及孔径分布仪测定, N_2 吸附质, 测定前样品在 50℃ 真空脱气 10 h; 磁性能由美国 Lake Shore 7304 振动样品磁强计

(VSM) 测定, 磁场强度范围 $-1.6 \times 10^6 \sim 1.6 \times 10^6$ A/m. 红外光谱分析使用德国 Bruker Tensor 27 红外光谱仪, KBr 压片.

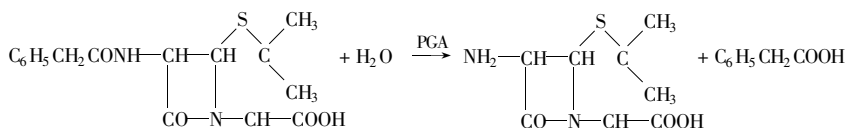
聚合物中 Fe_3O_4 的含量利用分光光度法测定, 使用 Milton Roy Company Sepctronic 21 分光光度计, 邻二氮菲为显色剂, 波长 $\lambda = 510 \text{ nm}$. 聚合物先经 500℃ 灼烧 4 h, 用 6 mol/L 盐酸溶解后进行分析.

聚合物中环氧基含量的测定方法参见文献 [8].

1.5 固定化酶的制备及其载酶量和表观活性的测定

固定化酶的制备和载酶量的测定, 称取 0.1 g 干燥磁性聚合物 (粒径 0.15 ~ 0.18 mm), 用去离子水润湿、溶胀, 吸去水后, 加入 2.60 mL 用 pH 7.8 的磷酸盐缓冲稀释的青霉素酰化酶溶液, 于 30℃ 水浴摇床中反应 72 h. 磁场中分离固定化酶, 用 Bradford 法测定上清液中酶蛋白质的质量^[9]. 固定化酶载酶量和偶联效率按下式计算:

$$\begin{aligned} \text{载酶量}(\text{mg/g}) &= \frac{\text{加入的酶蛋白质量} - \text{上清液酶蛋白质量}}{\text{载体质量}(\text{干重})} \\ \text{偶联效率}(\%) &= \frac{\text{加入的酶蛋白质量} - \text{上清液酶蛋白质量}}{\text{加入的酶蛋白质量}} \times 100\% \\ \text{青霉素酰化酶催化水解青霉素 G 钾盐生成 6-氨基青霉烷酸(6-APA)反应式如下:} \end{aligned}$$



固定化青霉素酰化酶催化水解青霉素 G 钾盐生成 6-APA 的表观活性采用碱滴定法测定^[10]. 固定化酶用去离子水洗涤数次, 至洗涤液中无蛋白质检出, 然后装入 100 mL 37℃ 恒温的反应器中, 加入 2 mL pH 7.8 的磷酸盐缓冲溶液和 8 mL 去离子水, 测定起始溶液的 pH 值. 控制机械搅拌转速为 150 r/min 下将 37℃ 恒温的 10 mL 4% 的青霉素 G 钾盐溶液移入反应器, pH 计监测下用标准 NaOH 溶液滴定水解产生的苯乙酸, 使反应体系的 pH 值不变. 记录反应进行前 3 min 所消耗的标准 NaOH 溶液的体积. 固定化酶的表观活性 A (IU/g) 由下式计算:

$$A(\text{IU/g}) = c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} \cdot 1000 / (m \cdot t)$$

式中, c_{NaOH} 为 NaOH 的摩尔浓度 (mol/L); V_{NaOH} 为消耗 NaOH 的体积 (mL); m 为载体干重 (g); t 为反应时间 (min).

2 结果与讨论

2.1 SEM 和 XRD 分析

图 1 为 MGM 磁性聚合物微球的 SEM 照片. 由图 1(a) 可知, 合成的 MGM 磁性聚合物呈球形, 微球之间没有粘连, 这说明用甲酰胺分散磁性 Fe_3O_4 , 以正庚烷与四氯乙烯混合溶剂作悬浮介质, 利用反相悬浮聚合技术能够合成亲水性磁性聚合物微球. 由图 1(b) 可以看到, 磁性 MGM 聚合物是由包裹着磁性 Fe_3O_4 微晶的微胶核粒子紧密

聚集而成,球体表面较为平整,表面上分布着许多
 孔隙,但尺寸不一.

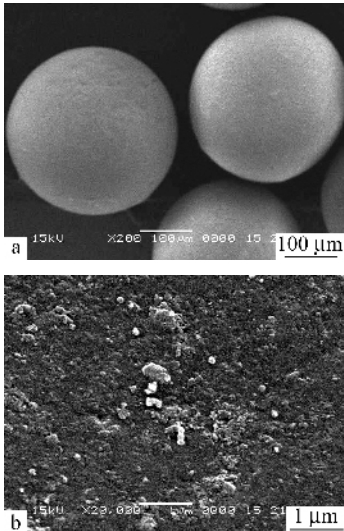


Fig. 1 SEM photographs of MGM magnetic polymer

用标准筛网筛分经真空干燥的 MGM 微球,
 对不同粒度样品称重,得到图 2 的粒径分布图.由
 图可见,合成的 MGM 磁性聚合物粒径分布较窄,
 主要集中在 0.13 ~ 0.28 mm,占总量 91%.利用溶
 胀法^[11]测出 MGM 磁性聚合物微球吸水率为
 131%,其具有良好的亲水性.

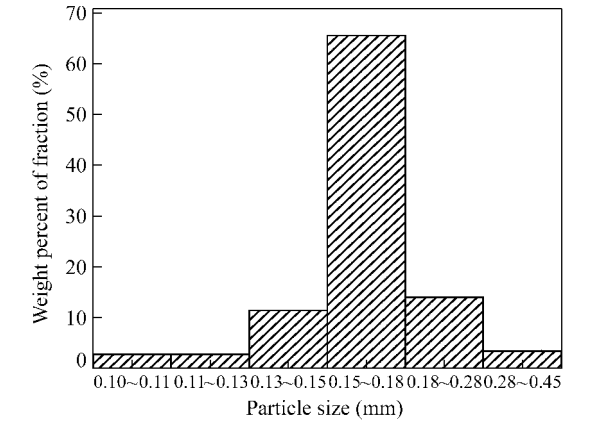


Fig. 2 Particle size distribution of MGM magnetic polymer

磁粉 Fe_3O_4 表面具有一定的亲水性,用极性
 溶剂甲酰胺不仅能够很好地分散 Fe_3O_4 成为均匀
 的磁流体,同时使 Fe_3O_4 粒子表面的亲水性得到
 进一步改善,这有利于提高 Fe_3O_4 粒子与亲水性
 单体 N,N' -亚甲基双丙烯酰胺和甲基丙烯酸缩水
 甘油酯的亲和作用.在反相悬浮聚合过程中,包含
 磁流体的单体相被分散成均匀稳定的液珠,在
 AIBN 引发剂作用下,单体分子发生交联聚合,

Fe_3O_4 粒子主要被包裹于聚合物的网络结构中.

从样品的 XRD 分析结果(图 3)可知,与 Fe_3O_4
 标准谱图相对照,合成的磁性 Fe_3O_4 具有倒立尖
 晶石结构,其 XRD 衍射图谱中衍射角 2θ 在
 $35.8^\circ, 62.8^\circ$ 和 30.2° 是立方 Fe_3O_4 的特征衍射峰
 (三强峰),分别对应于 (311), (440) 和 (220) 晶面.
 以 (311) 晶面衍射峰的半高峰宽数据,通过
 Scherrer 公式^[12]计算得到磁性 Fe_3O_4 的晶粒具有
 纳米尺寸,平均粒径为 11 nm. MGM 磁性聚合物的
 XRD 图中,与 Fe_3O_4 相对应的 (311), (440) 和
 (220) 特征衍射峰清晰可辨,且衍射角 2θ 值与
 Fe_3O_4 相应衍射峰的 2θ 值完全一致,说明在聚合
 反应过程中磁性 Fe_3O_4 的晶相结构未发生变化.
 同时也观察到, MGM 磁性聚合物的 XRD 图中, 2θ
 为 $15^\circ \sim 30^\circ$ 出现了宽化的衍射峰,这是非晶态聚
 合物的衍射峰,说明在 MGM 中高分子基本上是以
 无定型体存在的.

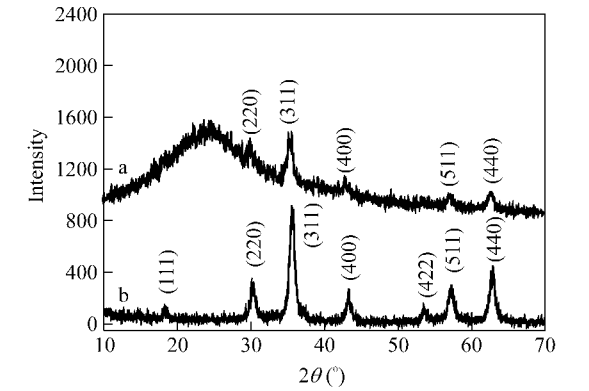


Fig. 3 XRD patterns of MGM magnetic polymer (a) and Fe_3O_4 (b)

2.2 聚合物的磁性能、比表面积和孔径分布测定

图 4 为用 VSM 测得的 MGM 聚合物微球的磁
 滞回线图形.磁滞回线呈 S 形,是铁磁性材料的典型
 曲线,说明合成的聚合物具有磁性.磁滞回线关于
 原点对称,当外加磁场 $H = 0$ 时, MGM 磁性聚
 合物微球没有剩磁存在 ($M = 0$),表明 MGM 聚
 合物微球具有超顺磁性.由 MGM 磁性聚合物微球
 的磁化曲线可知, MGM 聚合物微球的磁饱和强度
 为 6.5 emu/g.产生超顺磁性的原因是 Fe_3O_4 粉体
 经甲酰胺分散得很细小,造成聚合物中 Fe_3O_4 粒
 子小,粒子产生的单畴均表现出一个磁矩方向,
 在受到外加磁场作用时,磁畴取向均顺着外磁场
 达到磁饱和,而在外磁场消失时,磁畴取向均紊乱无
 序,因此没有剩磁存在. MGM 聚合物微球作生物

磁性聚合物微球对青霉素酰化酶固定化效果显著,其对 PGA 的偶联率为 47.2%. 固定化酶的载酶量为 30.0 mg/g,其水解青霉素 G 钾盐制备 6-APA 的表观活性达 502 IU/g,呈现出良好的催化活性. 同时在使用过程中,固定化酶小球没有出现磁聚集现象.

Table 1 Immobilization of PGA immobilized on MGM magnetic polymer

Support	Enzyme loading (mg/g)	Coupling yield (%)	Apparent activity (IU/g)
MGM	30.0	47.2	502

利用反相悬浮聚合技术合成的磁性聚合物微球 MGM,对青霉素酰化酶有很好的固定化作用,这与其结构和表面性质密切相关. 一方面,MGM

表面既存在可与酶一步键合的活性环氧基团,又有大量的亲水性的酰胺基团,对青霉素酰化酶不仅有很好的亲和作用,而且固定化过程对酶活力的损失小. 另一方面,MGM 作固定化酶的载体,其较高的比表面积(117.6 m²/g)和大量的孔道(孔径分布主要在 10 ~ 80 nm),使大量的酶分子能够进入载体内孔道与表面活性环氧基接触,导致固定化酶的载酶量高. 而在催化反应过程中,大孔道易于底物和产物分子的快速扩散,这些结果均有利于获得高催化活性的固定化酶. MGM 磁性聚合物微球固定化青霉素酰化酶,在磁场作用下能够快速彻底地与产物实现分离,且自身不出现流失,这对于其工业化应用有重要的实际意义.

REFERENCES

1 Chen J P,Su D R. Biotechnol Prog,2001,17(2) 369 ~ 375

2 Haik Y,Pai V,Chen C J. J Magn Magn Mater,1999,194(1-3) 254 ~ 261

3 Asmatulu R,Zalich M A,Claus R O,Riffle J S. J Magn Magn Mater,2005,292 108 ~ 119

4 Zhang Yonghua(章永化),Chen Shouming(陈守明),Chen Jianhua(陈建华),Xiong Hongbing (熊红兵),Zhang Qiwei(张启卫),Shen Hui(沈辉),Gong Kecheng (龚克成). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报),2003,24(9) 1717 ~ 1720

5 Xie Gang(谢钢),Zhang Hepeng(张和鹏),Zhang Qiuyu(张秋禹),Li Tiehu(李铁虎). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2003,(5) 626 ~ 630

6 Gu S,Shiratori T,Konno M. Colloid Polym Sci,2003,281(11) 1076 ~ 1081

7 Zhang Z M,Wan M X. Chinese J Polym Sci,2003,21(3) 271 ~ 276

8 Sundberg L,Porath J. J Chromatogr A,1974,90(1) 87 ~ 98

9 Bradford M M. Anal Biochem,1976,71 248 ~ 254

10 Xue P,Lu G Z,Guo Y L,Wang Y S,Guo Y. J Molecular Catalysis B:Enzymatic,2004,30(2) 75 ~ 81

11 Wang Xiaohua(王笑花),Wang Linge(王林格),Huang Yong(黄勇). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2005,(1) 66 ~ 70

12 Deng Jianguo(邓建国),He Chuanlan(贺传兰),Long Xinping(龙新平),Peng Yuxing(彭宇行),Li Bei(李蓓),Chen Xinzi(陈新滋). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2003,(3) 393 ~ 397

13 Lu Guanzhong(卢冠忠),Xue Ping(薛屏),WuYun Gaowa(乌云高娃),Guo Yanglong(郭杨龙),Wang Junsong(王筠松). Chinese patent(中国专利),1408859A. 2003-04-19

14 Wu Xingjia(吴星佳),Yang Sheng(杨晟),Wang Zheng(王峥),Zhan Xuanchi(詹选治),Yuan Zhongyi(袁中一). World Sci-Tech R&D(世界科技研究与发展),2001,23(1) 39 ~ 43

15 Kotha A,Raman R C,Ponrathnam S,Kumar K K,Shewale J G. React Funct Polym,1996,28(3) 235 ~ 242

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF HYDROPHILIC MAGNETIC POLYMER MICROSPHERES CONTAINING OXIRANES

XUE Ping, LIU Haifeng

(Key Laboratory of Energy Resource & Chemical Engineering, Ning Xia University, Yinchuan 750021)

Abstract Spherical hydrophilic magnetic polymer (MGM) containing oxiranes was synthesized by designing the inverse suspension polymerization system in which formamide was employed as the dispersant of magnetic Fe_3O_4 microcrystal. Scanning electron microscopy (SEM), FT-IR spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), vibrating sample magnetometer (VSM), low temperature N_2 adsorption and chemical analysis methods were used to characterize the properties of the polymer. The results showed that MGM had good spherical shape and narrow size distribution, and the particles with diameters ranging from 0.13 μm to 0.28 μm were about 91 wt%. The surface hydrophilicity of Fe_3O_4 microcrystal was improved by formamide dispersing treatment. The gel particles made by the copolymerization of glycidyl methacrylate and N,N' -methylene bisacrylamide could encapsule Fe_3O_4 microcrystal to produce colloid cores, and uniform and stable MGM microspheres were formed by the conglomeration of the colloid cores. The saturated magnetization of MGM reached 6.5 emu/g while the Fe_3O_4 content were 6.17%. The specific surface area, average pore diameter and pore volume and oxirane content was 117.6 m^2/g , 15.6 nm, 0.46 cm^3/g and 0.53 mmol/g, respectively. Penicillin G acylase (PGA) was immobilized on MGM microspheres by the covalent coupling between the reactive oxiranes of MGM and amino groups of PGA under mild conditions. The apparent activity of the immobilized PGA reached 502 IU/g for hydrolyzing penicillin G potassium to 6-aminopenicillanic acid at 37°C. There was no agglomeration of the magnetic particles in applications.

Key words Hydrophilic magnetic polymer, Oxirane, Inverse suspension polymerization, Penicillin G acylase, Immobilization