

二次乳化法(W/O)/W 制备蛋白质流通色谱固定相的研究*

孙国勇 史清洪 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,二甲基丙烯酸乙二醇酯为交联剂,甲苯与正庚烷为有机致孔剂,20%的甘油水溶液为内水相(超孔致孔剂),利用二次乳化法制备了(W/O)/W乳液,通过紫外光引发悬浮聚合生成两类孔型高分子微球(BiPB).BiPB孔径为双峰分布,范围分别在10~100 nm和1000~7300 nm之间;而其体积平均粒径、比表面积、湿密度、静态吸附容量与不含超孔的微孔介质(MiPB)接近.修饰相同二乙胺密度的BiPB和MiPB介质虽在较低流速(5 cm/min)下有相近的动态吸附容量,但在高流速(40 cm/min)下BiPB的动态吸附容量约为MiPB的动态吸附容量的3倍,表明BiPB介质的超孔结构对孔内传质的强化作用,因而其更适合于高速的蛋白质色谱分离.

关键词 二次乳化,两类孔型介质,光引发,悬浮聚合,吸附

液相色谱是一种重要的生物大分子的纯化工具,因其温和的使用条件而被广泛应用.通常,作为目标产物的生物大分子不仅浓度很低而且其所处环境很复杂,这往往意味着分离步骤的增加和生产周期的延长^[1].而目标分子长时间的暴露在人工环境下,对其活性也会造成很大的损失,因此缩短在色谱中的时间对保持蛋白质的结构与功能非常重要^[2].

分离介质是液相色谱的核心技术之一,由于介质的进步也扩展了液相色谱的使用范围.在液相色谱发展的初期,多糖类凝胶如琼脂糖、葡聚糖和纤维素等,是色谱介质的主要材料,因为它们便宜、易衍生、高孔隙率和高比表面.但由于其机械强度很差,不能应用于高速色谱^[3].象硅这类无机材料,能够增加分离度与操作流速,但是它在碱性(pH>9)条件下不稳定^[4,5].由于多糖与无机材料的缺点,有机介质得到很快的发展,它有高的机械强度并有很宽的pH使用范围(pH=1~12)^[6].

为了加快色谱的分离速度,Afeyan等开发出了具有两类孔型结构的色谱介质-流通色谱介质^[1,4,5].该介质含有两种类型的孔道,分别为孔径在600~800 μm 的穿透孔和50~100 μm 的扩散孔.穿透孔之间以扩散孔相连,保证了介质的比表面积和溶质的吸附容量.其最大的特点是分离速度快,可在数分钟内完成样品的分离;而常规的高效液相色谱往往需数十分钟到1小时^[7].流通

色谱通过孔内对流作用降低了溶质在介质内滞留的限制,明显缩短了蛋白质的分离时间,无论是分析层析还是制备层析,运行时得到的蛋白质质量、产量和产率都有所提高.

Larsson等利用(O/W)/O二次乳化法合成了含平均孔径为30 μm 超孔的琼脂糖凝胶介质^[8,9],染色的酵母细胞可穿过介质^[10].但由于琼脂糖的强度不高,在应用于流通色谱时不能够承受更大的流速.

基于二次乳化的思路,通过拓展本实验室已开发的固液联合制孔悬浮热聚合两类孔型介质技术^[11-13],本文报道了一种采用二次乳化法悬浮聚合生成新型聚合物两类孔型介质的方法.该方法以甘油水溶液及甲苯和正庚烷为致孔剂,除去非常容易;聚合过程采用紫外光引发悬浮聚合.在该两类孔型介质结构和孔径分布表征的基础上,本文考察了修饰二乙胺阴离子交换配基后两类孔型介质的吸附与色谱行为.

1 实验部分

1.1 材料与仪器

甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA),纯度大于99%,江苏安利化工有限公司;甲基丙烯酸乙二醇酯(EDMA)、牛血清蛋白(BSA)购自美国Sigma公司;甲苯、正庚烷,AR,天津化学有限公司;甘油、二乙胺、二氧六环,AR,天津大学科威有限公司;

安息香乙醚(BEE), AR, 北京医药公司, Span 80 和 Tween 80, AR, 天津凯通化工厂. 三羟甲基氨基甲烷(Tris), AR, 美国 Roche 公司; 盐酸(HCl), AR, 河北泊头化学试剂厂.

在介质的制备、表征和色谱研究过程中, 所采用的仪器包括 S-3500N 扫描电镜(日本 Hitachi 公司); Mastersizer2000 粒度分析仪(英国 Malvern 公司); Quantachrome Poremaster-60 汞压计(美国 Quantachrome 公司); TP690-A 型超声振荡器(德国 Elma 公司); pH 540 GLP 酸度计(德国 Wissenschaftlich 公司); Lamda 35 UV-VIS 分光光度计(美国 PE 公司); ÄKTA Explorer 100 色谱(英国 Amersham Biosciences 公司)等.

1.2 微球的聚合

两类孔型的高分子微球(BiPB)通过悬浮光聚合制备. 首先, 将有机致孔剂(3 mL 甲苯和 2 mL 正庚烷)、光引发剂(BEE 0.08 g)、反应单体(GMA 4.5 mL、EDMA 3 mL)、乳化剂(Span 80 0.45 g)混合均匀并在超声水浴内脱气 20 min; 接着将有机相与 8 mL 20% 的甘油溶液都转入一个反应器中. 在 8000 r/min 转速下搅拌 5 min(乳化 I)后, 迅速将形成的 W/O 乳化液转移到一个装有 60 mL 4% Tween 80 溶液中, 再以 1600 r/min 的转速搅拌 1 min(乳化 II). 最后将得到的二次乳化液转移到一个带有电磁搅拌的反应器中, 搅拌器转速为 300 r/min. 在紫外灯(1 kW)下进行光引发悬浮聚合 20 min. 待反应结束后, 收集反应制得的微球, 并以热水(60 ~ 70℃)彻底洗涤后, 在真空中干燥.

常规的微孔介质(MiPB)的制备方法: 用与 BiPB 相同比例的 GMA、EDMA、甲苯/正庚烷、BEE 混匀、超声脱气后直接加到 60 mL 4% Tween 80 溶液, 反应步骤与条件都与 BiPB 相同.

1.3 致孔剂的去除

将洗涤好并干燥的微球放置到 500 mL 的 Soxhlet 提取器中用无水乙醇回流 24 h, 除去微球中的有机致孔剂与乳化剂, 抽提后把微球放到室温下干燥, 然后再用蒸馏水清洗后干燥备用.

1.4 微球介质的表征

合成的聚合物微球分别采用 S-3500N 扫描电镜和 Mastersizer 2000 粒度分析仪进行结构表征和粒度分析; 微球的孔径用 Quantachrome Poremaster-60 汞压计进行测定; 比表面积用 BET Chembet-3000 进行测定; 含水比重用比重瓶进行测定.

1.5 配基修饰及修饰密度的测定

聚合物微球在 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH = 7.6)中溶胀后, 用二乙胺进行化学修饰, 具体操作如下 5.0 g 微球与 25 mL 二氧六环和 25 mL 二乙胺混合, 在 60℃ 反应 6.5 h. 待反应完成后, 清洗和抽滤微球, 将其置于 100 mL NaBH₄ (0.1 mol/L) 溶液中, 室温下振荡 12 h, 以使树脂上残余的环氧基充分还原为羟基. 待反应结束以后, 倾去上层液体及悬浮颗粒, 用去离子水充分洗涤. 然后用 G3 漏斗抽滤, 去离子水洗涤至中性后, 改用无水乙醇与去离子水反复洗涤 10 至 15 次, 然后在真空中干燥备用.

聚合物微球的修饰密度用其总离子容量来表示, 按照如下的方法进行测定. 修饰好的微球(1 g 左右)悬浮在 100 mL 的 1 mol/L 的 HCl 溶液中在 160 r/min 的水浴摇床中 25℃ 振荡 12 h, 再用 G3 漏斗过滤后用过量的无水乙醇清洗直到清洗后的无水乙醇达到中性, 然后再把微球放到 100 mL 0.5 mol/L 的 Na₂SO₄ 溶液中在 200 r/min 的水浴摇床中 25℃ 振荡 12 h 后用 G3 漏斗过滤, 所得到的滤液用 0.01 mol/L 的 AgNO₃ 溶液进行滴定(K₂CrO₄ 作指示剂), 用同体积的新的 Na₂SO₄ 溶液作为对照, 最后按照质量平衡计算总离子容量.

1.6 静态吸附

采用静态吸附法测定二乙胺修饰 BiPB 和 MiPB 对 BSA 的静态吸附等温线^[14]. 将介质置于锥形瓶, 用 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 7.6) 缓冲液在室温下浸泡 12 h. 经 G3 玻璃沙漏斗抽滤后, 称取分别湿介质 0.04 g 置于若干 25 mL 锥形瓶并依次加入 10 mL 浓度不同的 BSA 溶液. 密封后, 将锥形瓶置于 25℃ 恒温水浴中, 在 160 r/min 下震荡 24 h 后, 离心并取上清液测其在 280 nm 处的吸光度, 根据物料衡算, 利用 BSA 标准曲线计算离子交换介质的吸附量.

1.7 色谱性能

将所制备的离子交换树脂用乙醇匀浆法装入 HR5/10(5 mm ID, 100 mm 长, 1.96 mL) 的色谱柱中, 然后将其连接到 ÄKTA Explorer 100 色谱系统上, 用 0.01 mol/L 的 Tris-HCl 作为流动相平衡色谱柱. 动态吸附容量用迎头法进行测量, 在不同流速下用 2 mg/mL BSA 的 Tris-HCl 进行穿透实验, 按下式计算不同流速下的动态吸附容量.

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

其中 q_{10} 是为达到 10% 穿透时的动态吸附容量 mg BSA/mL bed, c 为料液中 BSA 的浓度 mg/mL, F 为流动相的体积流速 mL/min, 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, t_0 用 100 μ L 20% 的丙酮进行脉冲进样测定, V_g 为柱体积.

2 结果与讨论

2.1 微球的物理性质

图 1 是微球 BiPB 和 MiPB 的扫描电镜照片, 可以看出 BiPB 表面(图 1a)与 MiPB 表面(图 1b)差别很大, 其中 BiPB 表面有“海绵状”的超孔结构, 其是由乳化过程中甘油溶液的小液滴遗留下的孔穴, 而 MiPB 上只有微孔.

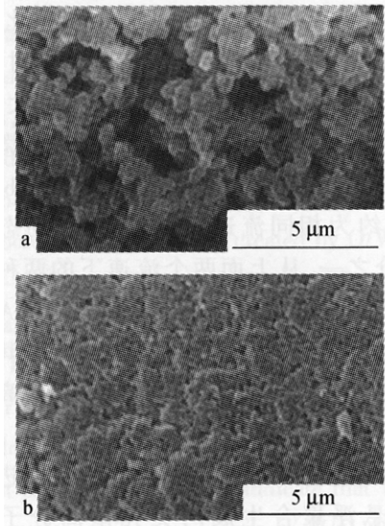


Fig. 1 SEM photographs of the BiPB (a) and MiPB (b)

微球上的孔径分布如图 2, BiPB 中的孔径主要分布在两个区域, 一个是 10 ~ 100 nm, 另一个是 1000 ~ 7300 nm, 而 MiPB 中的孔径主要集中在 10 ~ 100 nm 中. 这刚好与图 1 中的显微照片相对应, 类似的结果也出现在其它的研究中^[11,13].

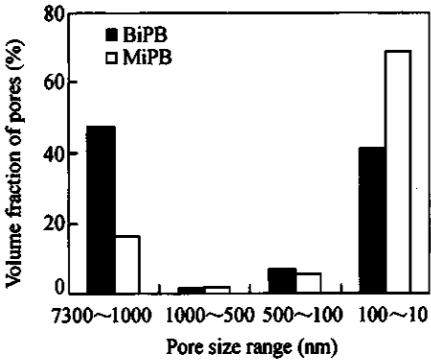


Fig. 2 Pore size distributions of the BiPB and MiPB

采用 Mastersizer 2000 粒度分析仪可以测定一次乳化中形成的小液滴的粒径(用正庚烷做连续相), 其结果如图 3 所示.

从图 3 可以看出, 乳化后的小液滴的体积平均粒径主要在 1 ~ 2 μ m, 这与应用汞压法测定到的结果相符.

表 1 列出了 BiPB 和 MiPB 微球体积平均粒径、比表面积、湿密度和离子交换容量. 从表 1 可见, 两种介质的平均粒径相近, BiPB 的比表面积小于 MiPB, 而其湿密度和离子容量均小于 MiPB.

2.2 静态吸附平衡

两种介质对 BSA 的静态吸附等温线如图 4 所示.

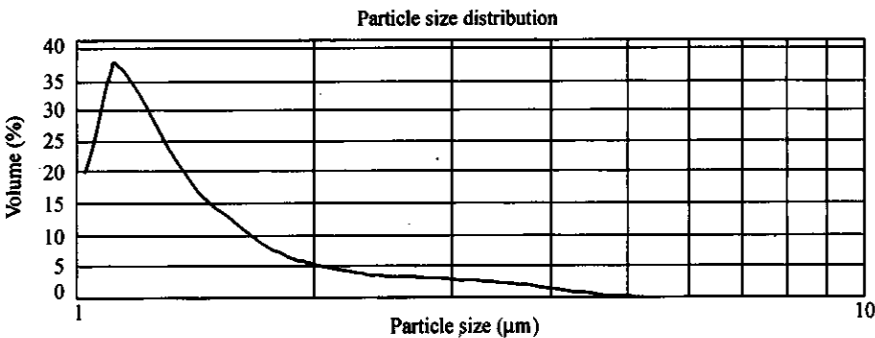


Fig. 3 Particle size distribution of emulsification I

Table 1 Physical properties of the two beads

Bead	Particle size (μ m)	Specific area (m^2/g)	Density (g/mL)	Total ion capacity (μ mol/mL)
BiPB	42.8	41.9	1.08	0.172
MiPB	42.4	52.1	1.11	0.213

从图 4 可以看出, 随着液相蛋白质浓度的增加, 蛋白质在离子交换介质上的吸附量迅速上升, 然后逐渐趋于饱和. 这种阴离子交换剂对 BSA 的吸附行为可用如下 Langmuir 吸附等温式进行描述:

$$q = \frac{q_m c}{K_d + c} \quad (2)$$

其中, q 是平衡吸附量(mg/g wet bead), q_m 为饱和吸附量(mg/g wet bead), c 为水相中蛋白质的平衡浓度(mg/mL), K_d 为吸附平衡解离常数(mg/mL). 通过计算可以得到 DEA-BiPB 和 DEA-MiPB 介质的 q_m 分别为 81.7 mg BSA/mL wet bead 和 87.3 mg BSA/mL wet bead, K_d 值分别为 1.37×10^{-2} mg/mL 和 1.33×10^{-2} mg/mL. DEA-BiPB 的比表面积与离子容量均低于 DEA-MiPB, 所以使得 DEA-BiPB 对 BSA 的饱和吸附容量要比 DEA-MiPB 的小.

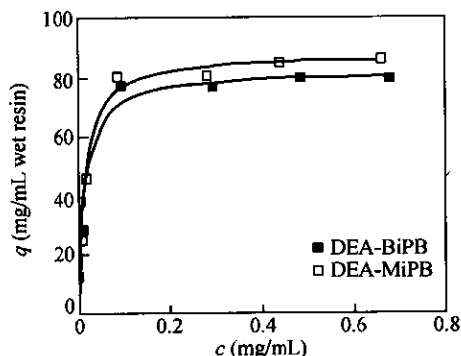


Fig. 4 Static adsorption isotherms of BSA to the DEA-BiPB and DEA-MiPB

2.3 色谱性能

对两种微球介质填充的色谱柱进行迎头法穿透, 得到不同流速下的穿透曲线图如图 5 和图 6.

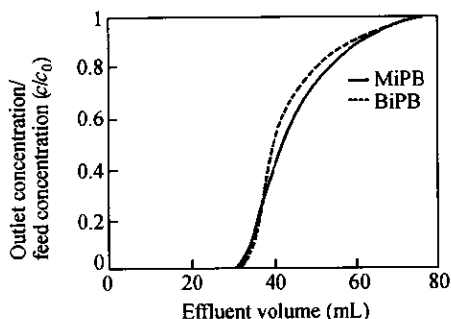


Fig. 5 Breakthrough curve of BSA at 5 cm/min

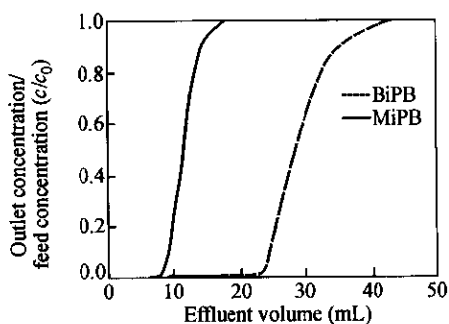


Fig. 6 Breakthrough curve of BSA at 40 cm/min

从图 5 可以看出在 5 cm/min 的流速下, DEA-BiPB 和 DEA-MiPB 的动态吸附容量相近(分别为 32.5 和 32.6 mg BSA/mL bed), 而随着柱中的流速的增加, DEA-BiPB 和 DEA-MiPB 的动态吸附容量都发生下降, 但是 DEA-BiPB 的吸附容量比 DEA-MiPB 的下降的缓慢的多; 到 40 cm/min 的时候(图 6), 增加流速对其动态吸附容量的影响不大(动态吸附容量为 23.3 mg BSA/mL bed), 而只有微孔的 DEA-MiPB 动态吸附容量(8.9 mg BSA/mL bed)急剧下降, 其约为相同流速下 DEA-BiPB 动态吸附容量的三分之一. 从上面两个流速下的两种介质的动态吸附容量的变化可以看出, 由于 DEA-BiPB 中有超孔进行对流传质, 所以增加流速对其动态吸附容量影响较小, DEA-BiPB 介质适宜在高流速下的色谱操作.

综上所述, 利用(W/O)/W 二次乳化法进行紫外光引发悬浮聚合生成两类孔型高分子微球 BiPB. 扫描电镜与孔径分析都可以看出该介质含有超孔和微孔; 而比表面积、湿密度、粒径和离子容量等都与常规的微孔型介质 MiPB 接近. 修饰后的阴离子交换介质 DEA-BiPB 虽然在较低流速下其动态吸附容量略低于 DEA-MiPB, 但是随着流速的增加, DEA-BiPB 通过超孔内的对流作用加快其内部传质使其在高流速下仍维持较高的动态吸附容量. 研究表明, 新型两类孔型高分子微球 BiPB 更适合于高速蛋白质流通色谱.

REFERENCES

- 1 Afeyan N B, Regnier F E, Dean R C. US patent, B01D 015/08, 5 019 270. 1991-05-28
- 2 McCarthy E, Vella G, Mhatre R, Lim Y. J Chromatogr A, 1996, 743(1): 163 ~ 170
- 3 Weaver Jr L E, Carta G. Biotechnol Progr, 1996, 12(3): 342 ~ 355
- 4 Afeyan N B, Fulton S P, Regnier F E. J Chromatogr, 1991, 544(2): 267 ~ 279
- 5 Afeyan N B, Gordon N F, Mazasroff L, Varady L, Fulton S P, Yang Y B, Regnier F E. J Chromatogr, 1990, 519(1): 1 ~ 27

- 6 Garcia M C, Marina M. L, Torre M. J. *Chromatogr A*, 2000, 880(1-2): 169 ~ 187
- 7 Sun Yan(孙彦). *Bioseparation Engineering(生物分离工程)*. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 1998. 190 ~ 191
- 8 Gustavsson P E, Larsson P O. *J Chromatogr A*, 1996, 734(2): 231 ~ 240
- 9 Larsson P O. US patent, C08B 037/16, 5 723 601. 1998-03-03
- 10 Gustavsson P E, Moshbach K, Nilsson K, Larsson P O. *J Chromatogr A*, 1998, 776(2): 197 ~ 203
- 11 Shi Y, Sun Y. *Chromatographia*, 2003, 57(1-2): 29 ~ 35
- 12 Shi Y, Sun Y. *Chromatographia*, 2002, 55(7-8): 405 ~ 410
- 13 Wu L, Bai S, Sun Y. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(4): 1300 ~ 1306
- 14 He L Z, Gan Y R, Sun Y. *Bioprocess Eng*, 1997, 17(5): 301 ~ 305

PREPARATION OF A BIPOROUS POLYMERIC ADSORBENT BY DOUBLE EMULSIFICATION FOR FLOWTHROUGH CHROMATOGRAPHY OF PROTEINS

SUN Guoyong, SHI Qinghong, SUN Yan

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

Abstract This paper reports a technique to fabricate the stationary phase for high-speed protein flowthrough chromatography. Using glycerol aqueous solution (20 wt%) and *n*-heptane/toluene organic solvent as the porogenic agents, a novel type of biporous matrix (BiPB) has been prepared by ultraviolet photo-polymerizing monomers (glycidyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate) by a (W/O)/W emulsification technique. It was found that there were two types of pores (micropores and superpores) in BiPB, but there was only micropores in the microporous beads (MiPB) created by O/W emulsification. The pores of BiPB were in the range of 10 ~ 100 nm and 1000 ~ 7300 nm, whereas those of MiPB were mainly 10 ~ 100 nm in size. The specific surface area, hydrated density and particle size of BiPB were 41.9 m²/g, 1.08 g/mL and 42.8 μm, respectively, similar to those of MiPB (52.1 m²/g, 1.11 g/mL and 42.4 μm). The static adsorption capacity of BiPB for bovine serum albumin (BSA) was also similar to that of MiPB. At a low flow rate (5 cm/min), the dynamic adsorption capacity (DAC) of BiPB for BSA was close to that of MiPB. At high flow rate (40 cm/min), however, the DAC of BiPB was about three times as high as that of MiPB. The results indicate that BiPB columns were promising for high-speed protein chromatography.

Key words Biporous matrix, (W/O)/W emulsification, Chromatography, Suspension polymerization, Protein adsorption