

新型低密度脂蛋白吸附剂的合成及吸附性能研究*

张克胜 孙君坦** 何炳林

(南开大学高分子化学研究所 吸附与分离功能高分子材料国家重点实验室 天津 300071)

摘 要 通过在交联聚乙烯醇水凝胶上固载牛磺酸合成了新型低密度脂蛋白吸附剂,体外吸附结果表明,该类吸附剂对低密度脂蛋白的吸附选择性与吸附率不仅与交联聚乙烯醇载体本身的交联度和牛磺酸的固载量有关,而且还受到不同病人血清及吸附剂的颗粒直径等因素的影响.该类吸附剂对血清总蛋白的影响较小.

关键词 交联聚乙烯醇,牛磺酸,低密度脂蛋白,总蛋白

人体血液中的脂类以脂蛋白的形式存在,可分为极低密度脂蛋白(VLDL),低密度脂蛋白(LDL),,高密度脂蛋白(HDL)及乳糜微粒(M),其中 VLDL 及 LDL 是富含胆固醇及胆固醇脂的脂蛋白,在正常情况下,它们可以通过分解代谢作用排出体外.医学研究结果表明^[1],血管硬化及心血管病患者的血液中的 LDL 及 VLDL 的含量远高于正常值,高浓度的 LDL 和 VLDL 是上述疾病的致病因素之一.一般患者可通过饮食及药物治疗降低 LDL 及 VLDL 的含量而达到治疗的目的,对于家族性遗传性高脂血症患者,由于其体内缺乏 LDL 及 VLDL 受体,因此 LDL 及 VLDL 不能通过正常的分解代谢作用排出体外而危及患者的生命.体外血液净化的方法如选择性吸附或滤过可以清除这类患者血液中高浓度的 LDL 及 VLDL,达到挽救患者的目的^[2].根据各种脂蛋白表面所带的电性、疏水性及颗粒大小等性质的不同可以设计对 LDL 具有高吸附选择性的吸附剂,如将肝素或磺化葡聚糖等聚阴离子固载到各种载体而制成的聚阴离子吸附剂,前者的灌流过程中需要超生理浓度的 Ca^{2+} 存在^[3,4],后者具有良好的吸附选择性,但存在配基的价格昂贵的缺憾^[5,6];将抗 LDL 抗体或特定的酶偶联到载体表面可得到免疫吸附剂,它们具有优良的吸附选择性和良好的血液相容性,同时也存在配基不易得到,价格昂贵及消毒困难等缺点^[7].小分子配体具有易得,价廉,固载容易且不易从载体上脱落等优点使之备受研究者的青睐^[8].

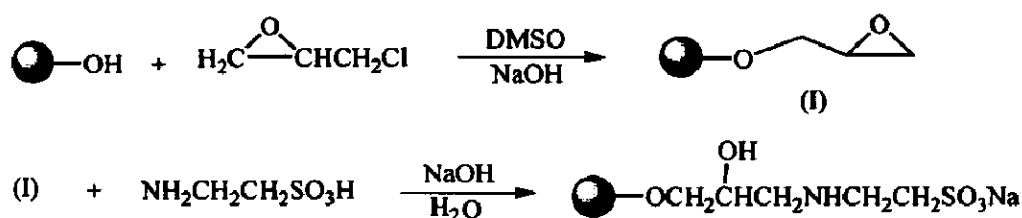
本文以价廉及血液相容性好的聚乙烯醇(PVA)为材料,以戊二醛为交联剂合成珠状交联聚乙烯醇凝胶并用环氧氯丙烷活化,然后在其表面固载了能识别血液中 LDL 及 VLDL 的牛磺酸而制备了 LDL 吸附剂以达到清除血液中高浓度 LDL 的目的.其合成路线见下页所示.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

聚乙烯醇(PVA),实验试剂,北京新光化学试剂厂(平均聚合度 1750 ± 50 ,醇解度

* 1998-07-02 收稿,1999-02-08 修稿;教育部博士点专项基金(批准号:9800504)资助课题;** 通讯联系人



97%以上);牛磺酸,湖州生物化学厂,生化试剂。

总胆固醇(TC)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒,总蛋白(TP)测定试剂盒均为北京中生生物工程高技术公司产品;其余试剂均为分析纯。

721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂);THZ88-1 台式多用恒温振荡仪(江苏太仓生化仪器厂)。

1.2 珠状交联聚乙烯醇凝胶的合成

按参考文献[9]方法合成球状交联聚乙烯醇凝胶。

交联度(%) = 参加交联反应的羟基摩尔数/聚乙烯醇羟基的总摩尔数 × %。

1.3 珠状交联聚乙烯醇凝胶与环氧氯丙烷的反应

将 4g 珠状交联聚乙烯醇和 12mL 的环氧氯丙烷与 40mL 二甲亚砜混匀后,在 40℃ 时于 30min 内滴入 40mL 2mol/L 的 NaOH 溶液,滴完后再继续反应 4h,滤出珠状体并用乙醇和水洗涤干净,得到含有环氧基的交联聚乙烯醇,在室温下干燥,按文献[10]测定环氧值。

1.4 牛磺酸的固载化反应

将 4g 含有环氧基的珠状交联聚乙烯醇用水充分溶胀后,加入 4g 牛磺酸和含 1.8g 氢氧化钠的 20mL 水溶液于 70℃ 反应 6h,滤出珠体,用水洗至中性,干燥。

1.5 吸附剂表面功能基含量的测定

精确称取 1g 左右已完全转化成磺酸型的吸附剂,加入 50mL 0.1mol/L 的 NaOH 溶液,在室温下浸泡 24h 后,从浸泡液中吸取 25mL 溶液,用 0.1mol/L 的 HCl 溶液进行滴定,按下式计算功能基的含量:

$$\text{牛磺酸的固载量}(\text{mmol/g}) = (50 \times \text{mol/L}_1 - \text{mol/L}_2 \times V_2) / W$$

其中 mol/L₁、mol/L₂、V₂、W 分别为标准 NaOH 的浓度(mol/L)、标准 HCl 的浓度(mol/L)、标准 HCl 的体积(mL)、吸附剂的质量(g)。

1.6 吸附剂吸附性能的测定

1.6.1 吸附实验 精确称取 0.2g 吸附剂于 5mL 的瓶中,用 2mL 生理盐水浸泡 24h,然后尽量吸干水份,向瓶中加入 0.5mL 病人的血清和 0.5mL 生理盐水,在 37℃ 振荡吸附 3h 后进行检测。

1.6.2 检测方法 采用酶法^[11]测定吸附前后血清中胆固醇的变化,并根据 LDL 和 HDL 所含胆固醇的量可表示 LDL 和 HDL 的含量,分别表示为 LDL-C 和 HDL-C,单位均为 mg/dL,总蛋白的变化采用双缩脲的方法进行测定,吸附率(A%)按下式计算:

$$A\% = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\%$$

C_0 为吸附前血清样品中总胆固醇(TC), 高密度脂蛋白中胆固醇(HDL-C), 低密度脂蛋白中胆固醇(LDL-C), 总蛋白(TP)的含量; C_t 为吸附 t 时间后血清中 TC、HDL-C、LDL-C、TP 的含量, 分别表示为 C^{TC} , C^{HDL} , C^{TP} .

2 结果与讨论

2.1 牛磺酸固载条件的研究

2.1.1 交联度对牛磺酸固载量的影响 环氧的固载量随聚乙烯醇的交联度的提高而降低, 进而导致牛磺酸固载量的降低. 交联度的提高降低了反应羟基的数目, 同时也降低了聚乙烯醇在水中的溶胀性能, 这些因素导致环氧固载量的降低. 从表 1 可看出, 牛磺酸的固载效率相对环氧的量是较低的, 可能在固载化过程中存在环氧基的水解和内部交联等副反应.

Table 1 The effect of cross-linking degree of PVA on the amount of taurine immobilized

Cross-linking degree(%)	6	8	10	12	14
Epoxy group immobilized (mmol/g)	2.83	2.62	2.44	2.18	2.08
Taurine immobilized (mmol/g)	0.92 (2.83)*	0.86 (2.62)	0.67 (2.44)	0.55 (2.18)	0.49 (2.08)
Percentage of taurine immobilized(%)	32.5	32.8	27.5	25.2	23.6

calculated values are given in parentheses

2.1.2 牛磺酸与氢氧化钠的摩尔比对固载量的影响 从表 2 可以看出, 在牛磺酸与 NaOH 的摩尔比大于 1 的情况下, 牛磺酸的固载量随着二者摩尔比的增加而增加; 当牛磺酸与 NaOH 的摩尔比小于 1 时, 牛磺酸的固载量随着摩尔比的增加而降低. 这是因为在牛磺酸与 NaOH 的摩尔比大于 1 时, 牛磺酸分子中游离氨基的量随着 NaOH 用量的增加而增加, 相应增加了反应体系亲核试剂的量而导致固载量的提高. 但当二者的摩尔比小于 1 时, 此时 NaOH 过量, 牛磺酸中的氨基完全游离, 反应体系中 NaOH 的量则随着牛磺酸与 NaOH 摩尔比的减小而增加, 在较高的固载温度下, 多余的 NaOH 不仅可以使含有环氧基团的交联聚乙烯醇载体本身发生交联反应, 而且还可以亲核进攻环氧基生成二醇, 因而导致牛磺酸固载量的降低.

Table 2 The effect of the molar ratio of taurine/NaOH on the amount of taurine immobilized on PVA₈

Molar ratio of taurine/NaOH	0.33	0.5	1	2	4
Taurine immobilized (mmol/g)	0.62	0.73	0.81	0.52	0.23

2.2 吸附剂交联度对吸附选择性的影响

各种蛋白颗粒都有一定的直径, 因此交联聚乙烯醇的网络尺寸的大小影响各种蛋白在其中的扩散. 交联聚乙烯醇表面联有牛磺酸功能基, 因此吸附剂带有负电荷, 而低密度脂蛋白表面带有正电荷, 其电性与对人体有益的高密度脂蛋白完全不同, 正是因为这种不同的电性作用使固载有牛磺酸的交联聚乙烯醇可选择性地吸附低密度脂蛋白而不吸附或较少吸附高密度脂蛋白. 从表 3 的结果可以看出, 随着交联度的提高, 吸附剂对低密度脂

蛋白和高密度脂蛋白吸附率均下降,但对低密度脂蛋白的吸附选择性提高了.这是因为交联网络尺寸随交联度的升高而减小,使扩散吸附过程减慢,表面功能基的对蛋白的识别作用得以加强,牛磺酸钠带有负电荷,可与带有正电荷的低密度脂蛋白形成强的静电作用而达到吸附目的,而通过扩散作用进行吸附的高密度脂蛋白不易被吸附.

Table 3 The relationship between the cross-linking degree of the adsorbents and their adsorption efficiency for TC, HDL, LDL in serum

Cross-linking degree(%)	Taurine immobilized (mmol/g)	C^{TC}	C^{HDL}	C^{LDL}	A^{TC}	A^{HDL}	A^{LDL}
6	0.92	64.5	24.4	40.1	49.9	19.7	59.2
8	0.86	75.8	26.2	49.6	41.1	13.8	49.5
10	0.67	83.2	26.9	56.3	35.4	11.5	42.7
12	0.55	85.7	28.1	57.6	33.4	7.6	41.4
14	0.49	91.1	28.7	62.4	29.2	5.6	36.5

$C_0^{TC} = 128.7\text{mg/dL}$; $C_0^{HDL} = 30.4\text{mg/dL}$; $C_0^{LDL} = 98.3\text{mg/dL}$

2.3 牛磺酸固载量对吸附的影响

由于 LDL 在吸附剂上的吸附主要通过 LDL 表面载脂蛋白所带的正电荷基团与吸附剂表面的负电荷基团之间的相互作用实现的,因此牛磺酸的固载量影响吸附剂的吸附性能.从表 4 可以看出,随着吸附剂表面牛磺酸固载数目的增加,对 LDL 的吸附性能也随之增加.从吸附选择性上看,随着牛磺酸数目的增加,对高密度脂蛋白(HDL)的吸附能力有所增加,这是因为牛磺酸含量的增加导致树脂的溶胀性能的增加和交联网络尺寸的增加,因此吸附质的扩散作用加强,导致吸附剂的吸附选择性降低.

Table 4 The relationship between the number of taurine immobilized on PVA and the adsorption efficiency of TC, HDL, LDL in serum

Resin number	Taurine immobilized(mmol/g)	C^{TC}	C^{HDL}	C^{LDL}	A^{TC}	A^{HDL}	A^{LDL}
1	0.31	88.4	27.7	60.7	32.6	9.2	39.7
2	0.64	85.3	27.1	58.2	34.9	11.2	42.1
3	0.83	78.5	26.2	52.3	40.1	14.1	48.0
4	0.86	75.8	25.6	50.2	42.2	16.1	50.1
5	0.87	72.6	25.2	47.4	44.6	17.4	52.9

$C_0^{TC} = 131.1\text{mg/dL}$; $C_0^{HDL} = 30.5\text{mg/dL}$; $C_0^{LDL} = 100.6\text{mg/dL}$

2.4 树脂颗粒大小对吸附的影响

脂蛋白(LDL 和 HDL)在树脂上的初始吸附过程为表面接触,然后再进行吸附,因此比表面的增加有利于吸附性能的加强.吸附剂颗粒直径越小,比表面积越大,其表面固载的功能基越多,对 LDL 的吸附率增加,而通过扩散作用实现吸附的 HDL 的吸附率会因 LDL 的优先吸附而降低.

Table 5 The effect of beads size on the adsorption efficiency of TC, HDL, LDL in serum

	C^{TC}	C^{HDL}	C^{LDL}	A^{TC}	A^{HDL}	A^{LDL}
Control serum(mg/dL)	123.7	32.3	91.4	—	—	—
PVA _g (20meshes)	77.7	28.2	49.6	37.1	12.7	45.7
PVA _g (60meshes)	73.7	28.9	44.8	40.4	10.5	51.0

PVA_g(20meshes) = 0.86mmol/g; PVA_g(60meshes) = 0.93mmol/g

2.5 不同病人血清对吸附的影响

同一种吸附剂对不同病人血清中的 LDL 的吸附性能有所不同,这是因为不同病人血清中的成分及比例各不相同,其中一些小分子物质、中分子物质和大分子物质也能被吸附剂吸附;另外病人血清中的致病因子的含量也有所不同,其存在比例的不同会影响吸附剂的吸附效果,表 6 的结果表明了这一点.

Table 6 The effect of different patients' serum on the adsorption efficiency of TC, HDL, LDL

Serum number	C_0^{TC}	C_0^{HDL}	C_0^{LDL}	C^{TC}	C^{HDL}	C^{LDL}	A^{TC}	A^{HDL}	A^{LDL}
1	106.4	27.3	79.1	59.3	23.7	35.6	45.2	13.2	54.9
2	136.5	31.1	105.4	88.5	26.7	61.8	35.2	14.2	41.4
3	103.2	30.3	72.9	59.5	25.6	33.9	42.3	15.5	72.4
4	125.2	31.5	93.7	84.1	26.9	57.2	32.8	14.6	38.9

2.6 吸附剂对血清中总蛋白的吸附情况

Table 7 The relationship between the cross-linking degree of the adsorbents and their adsorption efficiency for TP in serum

Crosslinking degree(%)	6	8	10	12	14
Taurine immobilized(mmol/g)	0.92	0.86	0.67	0.55	0.49
TP levels after adsorption(g/L)	35.5	37.6	38.2	38.8	39.5
Adsorption percentage(%)	14.3	9.2	7.7	6.3	4.6

$C_0^{TP} = 41.4\text{g/L}$

Table 8 The relationship between the amount of taurine immobilized on PVA and the adsorption efficiency of TP in serum

Taurine immobilized(mmol/g)	0.31	0.64	0.83	0.86
TP levels after adsorption(g/L)	37.6	37.1	36.5	36.1
Adsorption percentage(%)	5.3	6.6	8.1	9.1

$C_0^{TP} = 41.4\text{g/L}$

总蛋白(Total Protein, TP)可分清蛋白和球蛋白两大类,它是血清中的主要成分,在机体内发挥着重要生理功能,因此吸附剂对总蛋白的影响程度是衡量其性能优劣的一个重要指标.从表 7 和表 8 中可以看出,吸附剂对总蛋白的吸附率随着吸附剂交联度的提高和功能基固载量的减少而降低,这是因为载体的交联度增加使交联网络的尺寸减小,因此蛋白质在其中的扩散阻力增大,功能基含量的减少也使吸附剂的溶胀性能降低,从另一个方面增加了蛋白质在树脂中的扩散阻力.当交联度高于 8% 时,吸附剂可满足总蛋白的吸

附率不超过 10% 的临床医学要求。

REFERENCES

- 1 Brown M S, Goldstein J L. *New Engl J Med*, 1976, 294(25):1386~90
- 2 Behm E, Loth F, Todewe D, Ernst B, Klinkmann H. *Biomed Biochim Acta*, 1989, 48(10):829~837
- 3 Lupien P J, Moorjani S, Lou S. *Atherosclerosis*(Berlin), 1979(pub. 1980), 5th:466~469
- 4 Thies K, Prigent S, Heuck C C. *Artif Organs*, 1988, 12(4):320~324
- 5 Yokoyama S, Hayashi R, Kikkawa T, Tani N, Takada S, Hatanaka K, Yamamoto A. *Arteriosclerosis*(Dallas), 1984, 4(3):276~282
- 6 Yokoyama S, Hayashi R, Satani M, Yamamoto A. *Arteriosclerosis*(Dallas), 1985, 5(6):613~622
- 7 Wilhelm S, Thomas D. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 1981, 78(1):611~615
- 8 Chen Bing(陈斌), Li Chonghui(李崇辉), Pan Jilun(潘继伦), Tong Mingrong(童明容), Yu Yaoting(俞耀庭), Lin Xiaohua(林晓华). *Ion Exchange and Adsorption*(离子交换与吸附), 1992, 8(3):232~238
- 9 Zhang Kesheng(张克胜), Sun Juntan(孙君坦), He Binglin(何炳林), Gu Hanqing(顾汉卿). *Ion Exchange and Adsorption*(离子交换与吸附), 1998, 14(3):204~208
- 10 Zhang Zhixian(张志贤), Zhang Ruigao(张瑞镐). *The Quantative Analysis of Organic Functional Groups*(有机官能团定量分析). Beijing(北京):Chemical Industry Press(化学工业出版社), 1990. 136~142
- 11 Cui Fusheng(崔福生). *Handbook of Biomedical Detection*(医学生化检测手册). Tianjin(天津):Tianjin Academic Press(天津科学技术出版社), 1981. 224~225

PREPARATION AND PROPERTY STUDY OF A NOVEL ADSORBENT FOR LOW-DENSITY LIPOPROTEIN

ZHANG Kesheng, SUN Juntan, HE Binglin

(*Institute of Polymer Chemistry, The State Key Laboratory of Functional Polymer
Materials for Adsorption and Separation, Nankai University, Tianjin 300071*)

Abstract A novel adsorbent for the adsorption of Low-density Lipoprotein (LDL) was prepared by immobilizing taurine onto the cross-linked polyvinyl alcohol bead. The adsorption results indicated that this type of adsorbent could cut down in vitro the concentration of LDL and VLDL selectively. It's adsorption efficiency and selectivity depended not only on the amount of taurine immobilized and the degree of cross-linking of the polyvinyl alcohol, but also on the beads size and serum taken from different patients. The total protein was slightly effected by this novel adsorbent.

Key words Cross-linked polyvinyl alcohol, Taurine, Low-density lipoprotein, Total protein