

单分散树脂基质的弱阳离子交换色谱固定相的制备 及其在生物大分子分离中的应用研究

李 龙¹, 马桂娟¹, 龚波林^{1,2}

(1. 宁夏大学能源化工重点实验室, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学生物技术重点实验室, 宁夏 银川 750021)

摘要 采用分散聚合法制备种子和“一步种子溶胀聚合法”制备了粒径为 6 ~ 15 μm 的单分散多孔氯甲基苯乙烯-二乙烯苯微球。该微球经化学改性后得到一种亲水性良好的新型高效弱阳离子交换色谱固定相。详细考察了该固定相的表面亲水性、对标准蛋白的分离性能和盐的种类对蛋白质保留行为的影响。考察结果表明该固定相是一种性能优异的弱阳离子交换色谱固定相。将其应用于鸡蛋清中溶菌酶的快速分离纯化, 纯化后的溶菌酶纯度高于 96%, 比活高达 71 184 U/mg。

关键词 单分散多孔交联氯甲基苯乙烯-二乙烯苯微球 弱阳离子交换色谱 蛋白质分离

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2005)06-0567-06

Preparation of Weak Cation-Exchange Packings Based on Monodisperse Porous Poly (Chloromethylstyrene-co- Divinylbenzene) Beads and Its Applications in Separation of Biopolymers

LI Long¹, MA Guijuan¹, GONG Bolin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Energy & Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. Key Laboratory of Biotechnology, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: Monodisperse polystyrene seed particles were prepared by dispersion polymerization of styrene in ethanol and water under a nitrogen atmosphere using benzoyl peroxide as an initiator. Then the monodisperse, porous poly (chloromethylstyrene-co-divinylbenzene) beads in the range of 6 – 15 μm were prepared by one-step swelling and polymerization method. Based on this media, a new hydrophilic weak cation exchange stationary phase (WCX) for high performance liquid chromatography was synthesized by a new chemical modification method. The stationary phase was evaluated on the behavior of ion exchange, separability, and hydrophilicity. Effects of the nature of salts and pH value on the separation and retention of proteins of the stationary phase were investigated in details. It was found that the WCX resin follows ion exchange chromatographic retention mechanism. It was also used for the rapid separation and purification of lysozyme from egg white in only one step. The purity was found more than 96% and specific bioactivity of the purified lysozyme was as high as 71 184 U/mg.

Key words: monodisperse porous poly (chloromethylstyrene-co-divinylbenzene) beads; weak cation exchange chromatography; protein separation

颗粒单分散且具有一定孔结构的高分子聚合物微球作为一种有特殊用途的功能材料, 在分子科学以及相关应用领域中一直颇受重视。以这类树脂为基质的高效液相色谱填料具有优异的分离性能, 尤其对提高色谱柱的柱效和增强色谱柱的穿透性十

分有利^[1]。Ugelstad 等^[2-4]发明的“两步种子溶胀聚合法”被认为是合成单分散微球最为有效的方法。目前按照“两步种子溶胀聚合法”合成的聚合物微球有交联聚苯乙烯、交联聚甲基丙烯酸甲酯^[5]、交联聚甲基丙烯酸羟乙酯^[6]、交联甲基丙烯

收稿日期 2005-07-08

作者简介 李 龙, 男, 硕士研究生, 主要从事生物大分子的分离纯化。

通讯联系人 龚波林, 男, 博士, 教授, Tel: (0951) 2062300, E-mail: gongbl@nxu.edu.cn.

基金项目 科技部前期研究专项基金 (No. 2004CC05000)、国家自然科学基金 (No. 20465001) 和教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-04-0980) 资助项目。

酸环氧丙酯^[7,8]、交联乙烯酚^[9]、交联聚氯甲基苯乙烯^[10]等。利用该方法合成出的微球粒径易于控制,而且均匀性、单分散性非常好,只是制备过程比较繁琐,其中种球至少需要两步溶胀:一般是以无乳聚合法制备的粒径为 1 μm 左右的颗粒均匀的线性聚苯乙烯(PS)胶乳为种子,先用不溶于水的有机化合物将其活化,然后再用由单体、交联剂和稀释剂等组成的乳液进行第二步溶胀并聚合。

Ogino 等^[11]于 1995 年发明了“一步种子溶胀聚合”,并成功地制备了单分散交联聚苯乙烯树脂。交联聚苯乙烯微球表面呈现强的疏水性,作为固定相可直接应用于反相色谱和以有机溶剂为流动相的凝胶渗透色谱中;若将其用于以盐水为流动相的离子交换色谱,则必须对其表面进行涂覆^[7]。但这种涂覆后的固定相在连续使用中涂层易被洗脱,稳定性差。

本文采用分散聚合法和“一步种子溶胀聚合”制备了粒径为 6 ~ 15 μm 的单分散多孔氯甲基苯乙烯-二乙烯苯($P_{CMS-DVB}$)微球,并对其进行亲水性化学改性,制备了一种性能优异的新型弱阳离子交换色谱固定相(WCX),将其应用于鸡蛋清中溶菌酶的快速分离纯化,取得了较好的效果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括一台四元梯度泵及紫外-可见检测器(美国安捷伦公司),CGY-100 型高压气动泵(北京福思源机械加工部),2003 型电动搅拌器,超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技有限公司),XSP-3CA1 生物显微镜(上海光学仪器六厂),不锈钢柱管(10 cm × 0.46 cm i. d.)。

苯乙烯(St),化学纯,减压蒸馏后用无水硫酸镁干燥(上海试剂一厂);聚乙烯吡咯烷酮(PVP),分析纯,相对分子质量为 40 000 (Aldrich Chemical Company, Inc.) 过氧化苯甲酰(BPO),化学纯,用无水乙醇重结晶;无水乙醇,分析纯(天津化学试剂二厂);

对氯甲基苯乙烯(p -CMS),纯度为 90% (New Jersey, USA),减压蒸馏后用无水硫酸镁干燥;二乙烯苯(DVB),进口工业级,用 5% NaOH 溶液洗涤,再用水洗至中性,用无水硫酸镁干燥;甲苯,分析纯;邻苯二甲酸二丁酯,分析纯;聚乙烯醇(PVA);十二烷基硫酸钠(SDS);二乙醇胺;二甲基甲酰胺(DMF),减压蒸馏后使用;其他试剂均为分析纯。

标准蛋白质肌红蛋白(Myo,来源于马心)、胰蛋白酶原(trypsinogen)、核糖核酸酶(RNase-A,来源于牛红细胞)、细胞色素-C(Cyt-C,来源于马心)、溶菌酶(Lys)均购自美国 Sigma 公司。

1.2 分散聚合法制备单分散线性低相对分子质量的聚苯乙烯种子

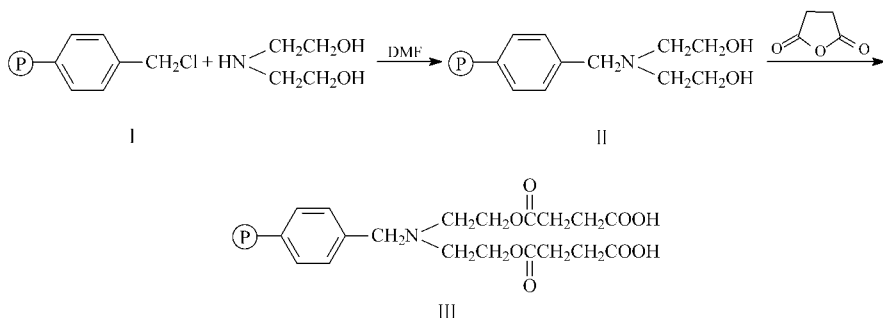
实验中以占总体质量 25% 的 St 作为单体,5% 的 BPO 作引发剂,将二者溶解于无水乙醇中后通氮气除氧,并于 70 °C 在无水乙醇介质中搅拌反应 24 h。产物用无水乙醇洗涤数次,转移至 0.2% SDS 溶液中备用。

1.3 单分散多孔交联 $P_{CMS-DVB}$ 微球的合成

以乙醇为介质,以分散聚合法制备的颗粒单分散线性聚苯乙烯为种子,在含有稳定剂和表面活性剂的水相介质中,用被乳化后的氯甲基苯乙烯、二乙烯苯、过氧化苯甲酰、甲苯和邻苯二甲酸二丁酯于室温下对种子进行溶胀 8 h,然后通氮气除氧,于 70 °C 下搅拌聚合 24 h。用热水反复洗涤,再用甲醇、丙酮分别洗涤数次,再于索氏提取器中用甲苯抽提 48 h,即制得粒径为 6 ~ 15 μm 的 $P_{CMS-DVB}$ 。

1.4 $P_{CMS-DVB}$ 微球的化学改性

将一定量的 $P_{CMS-DVB}$ 微球(I)加入圆底烧瓶中,再加入少量的 DMF,超声分散均匀后加入适量的二乙醇胺,混匀后于 80 °C 恒温下搅拌 24 h,冷却,分别用水、甲醇和丙酮洗涤数次,然后于真空下干燥;将干燥的产物(II)置于圆底烧瓶中,再加入适量的丁二酸酐,以吡啶为溶剂,于 60 °C 恒温水浴中搅拌 24 h,产物用水、稀 HCl、水反复洗涤后再用丙酮洗涤数次,烘干即得新型的多孔 WCX 填料(III)。合成路线如下(其中 P 代表聚合物):



1.5 树脂的表征

合成树脂的颗粒大小与表面形态用扫描电子显微镜观测;树脂的微孔性质采用比表面积测定(BET)法测定;大孔及中孔孔径由压汞法测定;利用电导滴定法测定树脂表面的羧基含量,即色谱填料的交换容量。

1.6 弱阳离子交换色谱柱的制备

取制备的 WCX 填料 1.2 g,以水为匀浆液,于 20 MPa 压力下将填料以匀浆法装入色谱柱管(10 cm × 0.46 cm i. d.) 中。

1.7 色谱条件

流动相:A 液(平衡液),20 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(pH 8.0);B 液(洗脱液),20 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(pH 8.0) + 1.0 mol/L NaCl 溶液。所有流动相在使用前均经 0.45 μm 滤膜过滤。检测波长 280 nm。

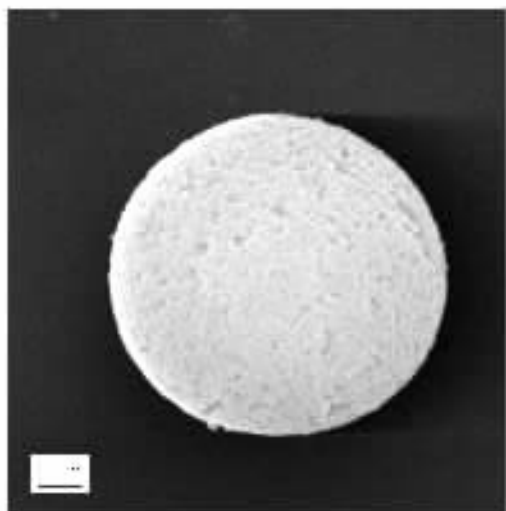
蛋白质进样量:分别精确配制 1 g/L 的 Myo, trypsinogen, RNase-A, Cyt-C 和 Lys 标准样品,混合进样量分别为 3, 20, 20, 20 和 20 μL。

1.8 鸡蛋清样品的处理

取新鲜的鸡蛋清 3.5 mL,向其中加入其 4 倍体积的平衡液,超声 15 min,加入 NaCl 并使其浓度达 1.0 mol/L。离心除去杂质,用所制备的 WCX 柱分离上清液。

2 结果与讨论

2.1 多孔 P_{CMS-DVB} 微球的制备



在制备单分散多孔 P_{CMS-DVB} 微球时,选用甲苯和邻苯二甲酸二丁酯作为混合致孔剂。在该溶胀聚合反应中,甲苯是热力学不良溶剂,邻苯二甲酸二丁酯是热力学良溶剂,以这两种混合溶剂作为混合致孔剂可以制备表面光滑的微球^[12],避免了制备的微球表面有缺陷。

在种子溶胀聚合反应中,制备的单分散微球的粒径(D)大小取决于所使用种子的粒径(d)以及种子被有机相(包括 CMS、DVB、BPO 和致孔剂)所溶胀的倍数。由于有机相在水中的溶解度很低,在有效溶胀范围内有机相基本上都被种子所吸收,因而溶胀聚合产物的 D 值可近似地用下式估算^[13]:

$$D = \left(\frac{V + v}{v} \right)^{\frac{1}{3}} \cdot d$$

式中: V 和 v 分别表示所用有机相和种子的体积, $(V + v)/v$ 为溶胀倍数。本文选择种子粒径为 3.6 μm,溶胀倍数为 5 ~ 20,交联度为 50%,致孔剂为 50%,制备出粒径为 6 ~ 15 μm 的单分散交联 P_{CMS-DVB} 微球。图 1 为所制备的粒径为 8 μm 微球的扫描电镜照片。

2.2 色谱柱的穿透性测试

压力-流速关系是评价离子交换填料性能的一个重要指标。从图 2 可以看出,该填充柱即使在较高的流动相流速条件下,柱的反压仍然相当低,而且流速-压力关系很好,这表明该树脂具有均匀的粒度、大孔结构和较强的穿透性,有利于色谱法快速分离和制备样品。

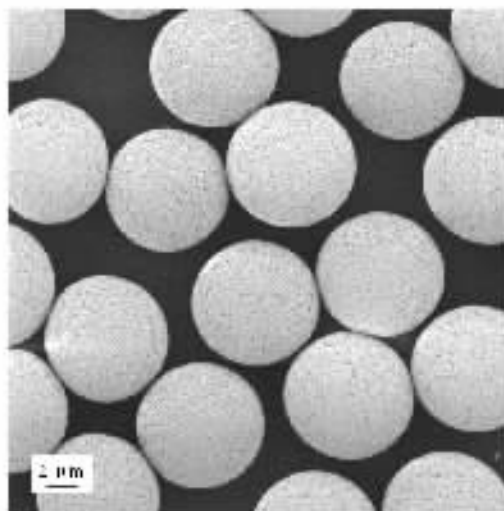


图 1 8 μm 多孔单分散氯甲基苯乙烯-二乙烯苯微球的电镜照片

Fig.1 Scanning electron micrographs of the 8 μm P_{CMS-DVB} beads

2.3 P_{CMS-DVB} 微球的化学改性

由于多孔 P_{CMS-DVB} 微球表面具有较强的疏水性,对生物大分子的不可逆吸附较强,用于生物大分子

分离具有很大的困难和局限性,因此对其表面进行亲水性化学改性非常有必要。为了增加 P_{CMS-DVB} 树脂表面的亲水性,将 P_{CMS-DVB} 树脂与二乙醇胺反应

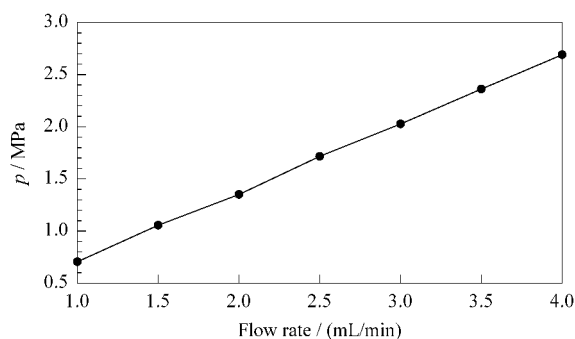


图 2 压力与流速的关系

Fig.2 Effect of flow rate on column back-pressure
WCX column size : 5 cm × 0.8 cm i. d.

后,再进一步与丁二酸酐反应生成弱阳离子交换填料。这两步亲水性改性反应有效避开了蛋白质分子与疏水性的聚合物苯基链的接触,有利于生物大分子的分离。

经测定,该 WCX 填料表面的羧基含量为 0.80 mmol/g。这表明,离子交换基团被键合到了聚合物微球上。

2.4 WCX 柱对生物大分子的分离性能

为了鉴定合成填料的离子交换特性,在 pH 8 的磷酸二氢钠缓冲体系中,用制备的 WCX 柱分离了等电点(pI)小于 7 的酸性蛋白质如 BSA(牛血清白蛋白)(pI = 4.9)、insulin(胰岛素)(pI = 5.4)、 β -lacto globulin(β -乳球蛋白)(pI = 5.17)等。发现所有被试验的酸性蛋白质在该色谱柱上均不保留,而碱性蛋白质如 trypsinogen(pI = 7.8)、RNase-A(pI = 8.9)、Cyt-C(pI = 10.3)和 Lys(pI = 11.1)在该色谱柱上发生离子交换作用而被保留。由图 3 可

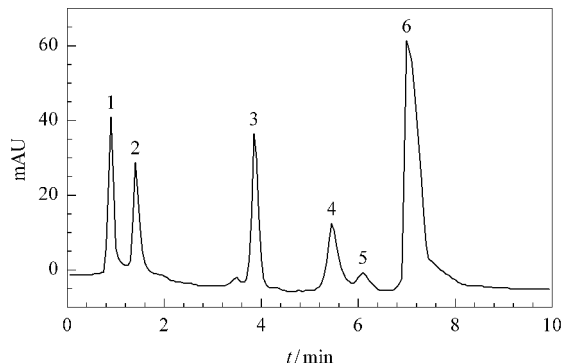


图 3 标准蛋白质在 WCX 柱上的色谱分离图

Fig.3 Chromatogram of standard proteins separated by WCX column

WCX column size : 10 cm × 0.46 cm i. d.

The linear gradient elution was from 100% solution A (20 mmol/L phosphate, pH 8.0) to 100% solution B (20 mmol/L phosphate-1.0 mol/L NaCl, pH 8.0) for 10 min and hold for 5 min at a flow rate of 1.0 mL/min. UV detection at 280 nm. AUFS, 0.08.

Proteins : 1. solvent + Myo ; 2. trypsinogen ; 3. RNase-A ; 4,5. Cyt-C ; 6. Lys.

以看出,5 种蛋白质在 10 min 内达到了基线分离,其分离性能与硅胶基质弱阳离子交换填料^[14]相当。

当流动相流速为 3.0 mL/min 时,该柱在 4 min 内能同样基线分离上述 5 种蛋白质,分离情况如图 4 所示,说明该基质微球内有大的传质孔存在。

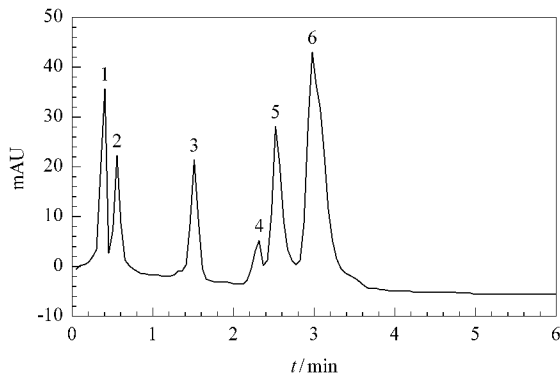


图 4 标准蛋白质在 WCX 柱上的快速分离图

Fig.4 Chromatogram for a fast separation of standard proteins by WCX column

WCX column size : 5 cm × 0.4 cm i. d.

The linear gradient elution was 5 min and flow rate of mobile phase was 3.0 mL/min. Other conditions and proteins are the same as in Fig. 3.

2.5 流动相中盐的种类对蛋白质保留的影响

在流动相中,盐的种类非常重要,它与 pH 共同控制着蛋白质在离子交换色谱柱上的保留行为、分离度和回收率。蛋白质的带电特征和离子化程度决定了蛋白质在离子交换柱上保留的变化。图 5 为不同种类的盐对蛋白质在 WCX 柱上保留行为的影响。由图 5 可以看出,使用 KCl 为洗脱盐时的保留时间比使用 NH_4Cl 的短,而使用 NH_4Cl 又比使用 NaCl 时的保留时间短,说明这 3 种盐的置换顺序为 $\text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+$,这与阳离子交换色谱的置换规律一致。本文选用常用的 NaCl 就可以达到较好的分离效果。

2.6 流动相中的有机溶剂对蛋白质保留的影响

流动相中加入有机溶剂能够抑制蛋白质与固定相之间的疏水性相互作用,从而减小蛋白质的保留时间或洗脱体积。人们常用这一规律表征固定相表面的疏水性。图 6-a 和 b 分别是 5 种蛋白质在流动相中不加异丙醇和加入 5% 异丙醇时的分离图。由图 6 可以看出,流动相中添加异丙醇与否对蛋白质的保留时间几乎没有影响。这表明该 WCX 仅具有弱的疏水性,对蛋白质的保留贡献已很小,这也进一步说明此填料的化学改性方法是合理的。

2.7 WCX 柱的吸附容量

色谱柱性能的优劣主要取决于色谱柱对生物样品的活性回收率、分离性能及其柱容量。离子交换色谱中柱容量的大小与固定相基质的结构及比表面

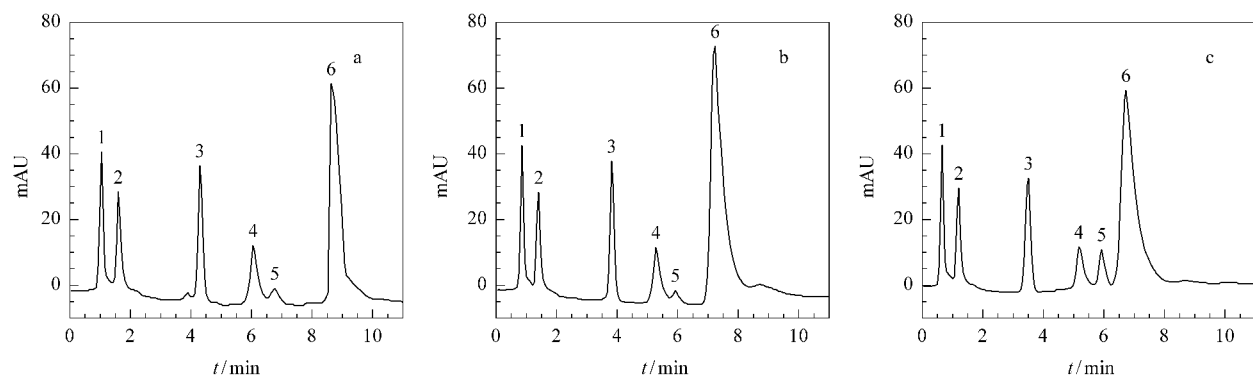


图 5 流动相中不同种类的盐对蛋白质保留时间的影响

Fig.5 Effect of the nature of different salts on the retention of the proteins

a. NaCl ; b. NH_4Cl ; c. KCl.

Except the nature of salts, all chromatographic conditions are the same as in Fig. 3.

Proteins : 1. solvent + Myo ; 2. trypsinogen ; 3. RNase-A ; 4, 5. Cyt-C ; 6. Lys.

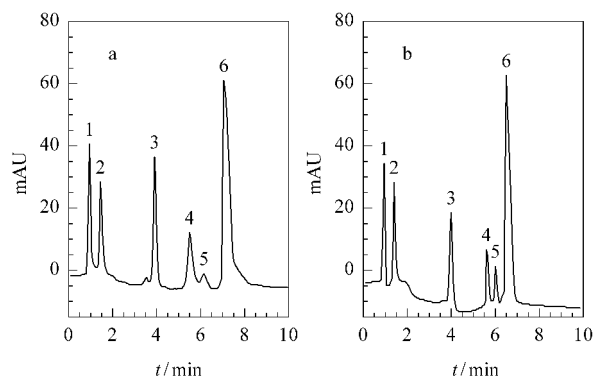


图 6 流动相中有机溶剂的加入对蛋白质保留时间的影响

Fig.6 Influence of organic solvent in the mobile phase on protein elution

a. without isopropanol added ; b. 5% isopropanol added in both solutions A and B.

Other conditions and peaks are the same as in Fig. 3.

积的大小、配基的结构及交换基团的密度、色谱条件及分离对象等因素有关。若单位体积的填料中交换基团多,对蛋白质的吸附点就多,柱容量就大。将一定量的 Lys 溶于磷酸盐缓冲溶液中,精确称取一定量的 WCX 填料浸泡于该溶菌酶溶液中,振摇 12 h,离心分离除去填料,上清液经紫外分光光度计测定其吸光度,与标准蛋白质的吸光度对比,得出其静态吸附容量。3 次平行测定该 WCX 填料对 Lys 的静态吸附容量平均值为 17.4 mg/g。

2.8 鸡蛋清中溶菌酶的分离及纯化

鸡蛋中鸡蛋清占总质量的 58%,其中有大约 10% ~ 12% 的水。鸡蛋清中的蛋白质主要有卵清蛋白、卵蛋白、球蛋白和伴清蛋白,它们分别占了 54%,11%,10%,13%,而溶菌酶大约占 3.5%。Levison 等^[15]利用 Whatman DE92 型阴离子纤维素大量分离了鸡蛋清中的卵清蛋白,并取得了较好的分离效果。

本文采用自制的 WCX 柱 (10 cm × 0.46 cm i. d.) 在 6 min 内对鸡蛋清中的 Lys 进行快速分离纯化。图 7 为采用 WCX 柱对鸡蛋清中 Lys 的一步分离纯化图。由于 Lys 的 pI 值为 11.1,在该实验条件下,其净电荷为正,所以在阳离子交换色谱柱上会保留,而卵蛋白、卵清蛋白、球蛋白和伴清蛋白的 pI 值分别为 4.0,4.6,5.5 ~ 5.8,6.6,在该实验条件下,它们的净电荷为负,因此在 WCX 柱上不保留;于是鸡蛋清中的 Lys 与其他杂蛋白质得到了分离。经进一步测定得到,分离纯化后的 Lys 的纯度达到了 96.2% (相对标准偏差 (RSD) 为 13.95% ($n = 4$)),比活为 71 184 U/mg。

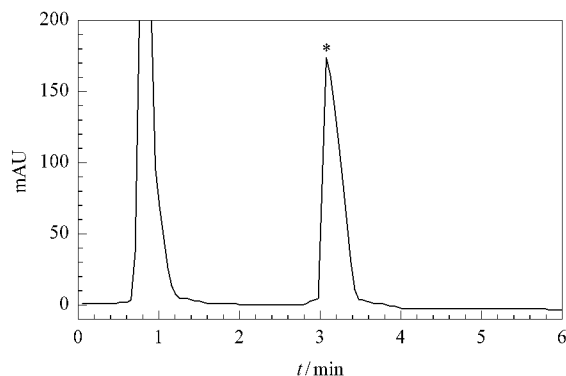


图 7 鸡蛋清中溶菌酶的快速分离纯化

Fig.7 Chromatogram for fast purification of lysozyme from egg white

Except the linear gradient in 5 min and flow rate of mobile phase being 3.0 mL/min, other conditions are the same as in Fig. 3.

* Lys.

3 结论

本文采用分散聚合法制备种子和“一步种子溶胀聚合法”制备了多孔单分散的 $\text{P}_{\text{CMS-DVB}}$ 微球,以其为基质,经化学方法改性后得到了一种亲水性良好

的高效弱阳离子交换色谱填料。该填料有以下几个优点:(1)与硅胶基质的填料^[14]相比,适用于宽的 pH 值范围,并具有高的柱负载;(2)与 dextran 和 agarose 基质的填料^[16]相比,具有强的化学和机械稳定性;(3)与以 PS-DVB 为基质的 WCX 柱填料^[17]相比,稳定性好,亲水性强,蛋白质的活性回收率高。该 WCX 柱用于鸡蛋清中溶菌酶的快速分离及纯化,取得了较好的效果。

参考文献:

[1] Jin Chao, Yang Yanguo, Zhao Zhongzhang, Yang Shuming, Tian Xiulan, Su Tiansheng. Chinese Science Bulletin (金超, 杨彦果, 赵中璋, 杨树明, 田秀兰, 苏天升. 科学通报), 1999, 44(18):1951

[2] Kulin L I, Flodin P, Ellingsen T, Ugelstad J. J Chromatogr, 1990, 514:1

[3] Ellingsen T, Aune O, Ugelstad J, Hogen S. J Chromatogr, 1990, 535:147

[4] Ugelstad J. J Polym Sci: Polym Symp, 1985, 72:225

[5] Smigol V, Svec F. J Appl Polym Sci, 1992, 46(8):1439

[6] Smigol V, Svec F, Frechet J M J. J Liq Chromatogr, 1994,

17(4):891

[7] Gong B L, Ke C Y, Geng X D. Anal Bioanal Chem, 2003, 375:769

[8] Gong Bolin, Ke Congyu, Geng Xindu. Chinese Journal of Chemistry (龚波林, 柯从玉, 耿信笃. 中国化学), 2004, 22:283

[9] Smigol V, Svec F, Frechet J M J. J Liq Chromatogr, 1994, 17:259

[10] Yang Ruiqin, Jiang Shengxiang, Liu Xia, Chen Liren. Chinese Journal of Chromatography (杨瑞琴, 蒋生祥, 刘霞, 陈立仁. 色谱), 1999, 17(3):296

[11] Ogino K, Sato H, Tsuchiya K, Suzuki H, Moriguchi S. J Chromatogr, 1995, 699:59

[12] Xu M C, Peterson D S, Rohr T, Svec F, Frechet J M J. Anal Chem, 2003, 75:1011

[13] Hosoya K, Frechet J M J. J Polym Sci, Part A: Polym Chem, 1993, 30:2129

[14] Chang Jianhua, Han Yaping. Chemical Journal of Chinese Universities (常建华, 韩亚萍. 高等学校化学学报), 1994, 15:1317

[15] Levison P R, Badger S E, Toome D W, Koscielny M L, Lane L, Butts E T. J Chromatogr, 1992, 590:49

[16] Stellan H, Liao J L. J Chromatogr, 1988, 457:165

[17] Varady L, Ning M, Yang Y B, Cook S E, Afeyan N, Regnier F E. J Chromatogr, 1993, 631:107

《色谱》编辑部新网站开通

为了能为编者、作者、读者和审稿专家搭建一个方便快捷的信息交互平台,经过近半年的努力,《色谱》编辑部具网上在线投稿、网上实时查稿和网上在线审稿功能的新网站已于近日开通,目前处于试运行阶段。新网址是 www.chrom-China.com,欢迎广大作者和审稿专家登录使用,并就使用中出现的向《色谱》编辑部提出宝贵意见和建议。

在试运行阶段,作者可以任选两种方式之一投稿(网上投稿或 E-mail),我们欢迎和鼓励作者通过网上在线方式投稿。投稿后的作者可通过用户名、口令或输入稿件名称、作者姓名实时查询稿件在编辑部的最新处理状态。审稿专家可通过输入姓名、口令在线提交评审意见。

编辑部联系方式:

电 话:(0411)84379021

E-mail:sepu@dicp.ac.cn

联系人:李美琴

《色谱》编辑部
2005 年 11 月