

以单分散交联聚甲基丙烯酸环氧丙酯树脂 为基质的亲水性排阻色谱固定相的合成及其 在生物大分子分离中的应用

龚波林 王超展 王骊丽 耿信笃*

(西北大学现代分离科学研究所, 现代分离科学省重点实验室, 西安 710069)

摘 要 以单分散交联聚甲基丙烯酸环氧丙酯树脂为基质, 将该树脂经化学改性后得到亲水性良好的新型尺寸排阻色谱固定相, 其表面羟基含量高达 6.1 mmol/g。详细评价了该改性后树脂对蛋白的质量回收率、亲水性、耐压性能及化学稳定性。用三羟甲基胺基甲烷 (Tris) 缓冲溶液 (pH = 7) 为流动相, 对蛋白质混合样的分离遵循体积排阻色谱分离机理。

关键词 单分散交联聚甲基丙烯酸环氧丙酯微球, 尺寸排阻色谱, 生物大分子

1 引 言

尺寸排阻色谱 (size exclusion chromatography, SEC) 在生物大分子的分析与分离中占有重要的地位。众所周知, SEC 固定相主要有无机和聚合物基质两大类。聚合物基质不溶于有机溶剂, 在 pH 为 1~14 的溶剂环境中具有良好的化学稳定性及介质表面不存在自由离子等优良特征。过去 SEC 都是采用软的亲水性凝胶为基质, 如 Bio-Gel P、Sephadex、Sephacrose 等。这些凝胶不能承受较高的柱压。20 世纪 70 年代末出现的刚性交联聚苯乙烯微球是应用最为广泛的一种聚合物基质色谱固定相, 但该微球表面呈现极强的疏水性。作为色谱固定相可直接用于反相色谱和以有机溶剂为流动相的 SEC 中, 若用于以盐水为流动相的 SEC 分离, 就必须对其表面进行涂覆^[1]。这类填料在连续使用中涂层易被洗脱, 稳定性差。键合甘油的交联聚苯乙烯树脂虽化学稳定性好, 但微球的表面仍存在较强的疏水性^[2]。文献^[3]报道了用甲基丙烯酸环氧丙酯为单体, 亚乙基二甲基丙烯酸酯为交联剂, 采用一步种子溶胀聚合^[4]制备了孔径分布合适的单分散交联聚甲基丙烯酸环氧丙酯树脂 (P_{GMA/EDMA})。

本实验用该树脂为基质, 采用化学键合法, 制备了亲水性良好的新型 SEC 固定相, 并研究了其表面化学性质及对蛋白质的色谱分离性能。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

LC-10A 高效液相色谱仪, 采用 SPD-10AV 可变波长紫外-可见检测器 (日本岛津公司); KQ-250 型超声波发生器 (江苏昆山市监测仪器厂)。

单分散交联聚甲基丙烯酸环氧丙酯树脂 (合成方法见文献^[3]); 环氧氯丙烷 (西安化学试剂厂), 分析纯; 0.5% (V/V) 高碘酸溶液; 0.1 mol/L 标准硫代硫酸钠溶液; 20% (V/V) 碘化钾溶液; 1% (V/V) 淀粉水溶液; 蛋白质: 铁蛋白 (Fer)、溶菌酶 (Lys)、卵清蛋白 (OVA)、 α -糜蛋白酶原 (α -Chy-A)、伴清蛋白 (CON) 和五肽 (Five-peptide) 均购自美国 Sigma 公司。其它化学试剂均为分析纯。

2.2 SEC 固定相的合成

2.2.1 P_{GMA/EDMA} 树脂的水解 该树脂 10 g 用 15 mL 乙醇溶胀 1 h, 然后加入 80 mL 0.1 mol/L H₂SO₄, 60 °C 水浴搅拌反应 24 h。反应产物水洗 3 次, 水中浸泡过夜, 再用水洗涤, 真空干燥得水解的微球。

2.2.2 SEC 固定相的合成 取 10 g 水解的 P_{GMA/EDMA} 树脂悬浮于 150 mL 由二甲亚砜和 4 mol/L

2003-07-01 收稿; 2003-12-19 接受

本文系国家自然科学基金资助项目 (No. 39880003 和 No. 20175016)

NaOH (9/1, V/V)组成的混合溶液中,室温搅拌 1 h 后加入 30 mL 环氧氯丙烷,于 40 °C 水浴中搅拌反应 4 h。所得树脂依次用水和丙酮洗涤,真空干燥。该树脂再用 0.1 mol/L H_2SO_4 60 °C 水浴搅拌反应 24 h,即可制备新型 SEC 填料。合成反应如图 1。

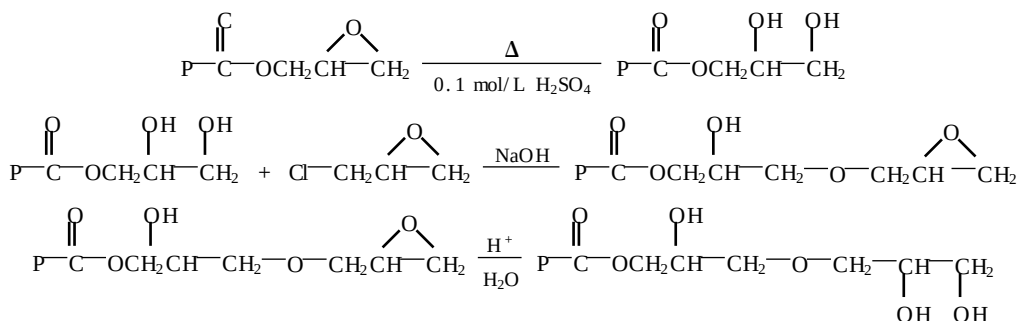


图 1 SEC 填料的合成路线

Fig. 1 Synthetic route for size exclusion chromatographic (SEC) packing materials

2.3 羟基含量的测定和色谱填装

按照文献[5],用高碘酸滴定法测定固定相表面的多羟基含量。以甲醇为匀浆液,在 20 MPa 压力下以匀浆法装柱,柱管为:250 mm × 7.9 mm i. d. 不锈钢柱。

2.4 SEC 条件

流动相:0.02 mol/L Tris + 0.15 mol/L NaCl,流速:0.5 mL/min,衰减:0.08; pH = 7.0; $\lambda = 280 \text{ nm}$ 。

2.5 溶菌酶的活性测定方法

按照文献[6],用溶壁球菌为底物测定溶菌酶的活性。

3 结果与讨论

3.1 $P_{GMA/EDMA}$ 树脂中环氧值的测定

采用一步种子溶胀聚合法合成的 $P_{GMA/EDMA}$ 是一种新型高分子树脂^[3],颗粒为单分散,平均直径 8 μm ,多孔(平均孔径为 89.1 nm),交联度 50%,具有机械强度高的特点,可进行快速洗脱,表面的环氧基易于进行修饰。将 $P_{GMA/EDMA}$ 树脂的环氧基水解为邻二醇,然后用 NaIO_4 氧化邻二醇为醛,最后利用醛基与 2,4-二硝基苯肼反应来检测环氧基含量,以计算环氧基含量。 $P_{GMA/EDMA}$ 树脂的环氧基含量为 3.1 mmol/g。表明该树脂的环氧基含量比较高。

3.2 柱子的穿透性测试

压力-流速关系是评价 SEC 填料柱性能的一个重要指标。从图 2 看出,即使该填充柱在较高的流速条件下,柱子的操作压力仍然相当低,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,有利于色谱快速分离和制备。

3.3 $P_{GMA/EDMA}$ 树脂表面的亲水性改性

尽量减少 $P_{GMA/EDMA}$ 树脂表面未键合的、具有疏水性的表面面积是合成 SEC 填料的关键。因此,在反应前应选择一种既能使微球充分溶胀又与水解溶液稀硫酸相混溶的有机溶剂对微球溶胀一定时间,以利于试剂分子充分进入微球内部发生反应。本实验选用乙醇溶胀微球。

要合成 SEC 填料就必须对 $P_{GMA/EDMA}$ 树脂表面进行亲水化处理。本实验采用两种改性方法合成 SEC 填料。改性树脂 I 按照 Tennikova^[7]的改性方法将树脂表面的环氧基直接水解生成邻二醇,羟基含量为 4.7 mmol/g。虽表面具有一定亲水性,但还有小的疏水区域将会导致蛋白的不可逆吸附^[8];改性树脂 II

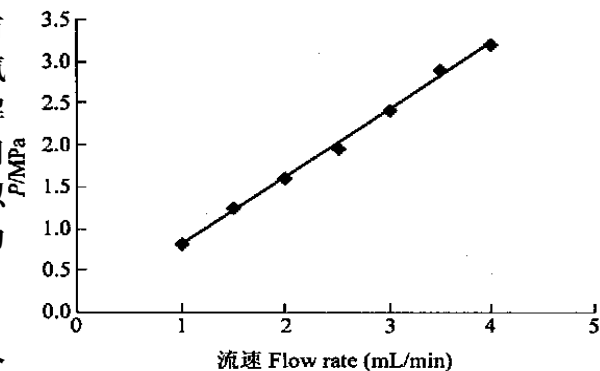


图 2 流速对柱压力的影响

Fig. 2 Effect of flow rate on column back pressure

柱子(column): 25 mm × 0.79 cm i. d.; 流动相(mobile phase): 20 mmol/L phosphat buffer solution。

为了增加树脂表面的亲水性,将水解的树脂与环氧氯丙烷反应后,进一步水解新生成的环氧基(见图 1)。该亲水性改性反应有效避开了蛋白分子与疏水性的聚合物主链接触^[9],树脂表面的羟基含量高达 6.1 mmol/g(该改性方法未见文献报道)。可见改性树脂 II 优于树脂 I,本实验选用改性树脂 II。

3.4 有机溶剂对蛋白保留的影响

流动相中加入有机溶剂能够抑制蛋白与固定相之间的疏水相互作用,从而减小蛋白的保留时间或洗脱体积^[7]。用这一规律可表征固定相表面的疏水性。表 1 是 4 种蛋白分别在含有 10 %异丙醇、0.02 mol/L 的 Tris + 0.15 mol/L NaCl 的溶液中的保留时间。由表 1 可以看出,蛋白保留时间均有不同程度地减小,但减小量非常小。这表明该 SEC 固定相仅存在弱的疏水性,对蛋白保留的贡献已很小,也进一步说明此填料的化学改性方法是合理的。

表 1 异丙醇对蛋白保留时间的影响

Table 1 Effect of isopropanol on retention of proteins

蛋白质 Proteins	铁蛋白 Fer (t/min)	伴清蛋白 CON (t/min)	α糜蛋白酶原 α-CHy-A (t/min)	五肽 Five-peptide (t/min)
洗脱液 A Eluent A *	4.82	6.21	7.10	8.05
洗脱液 B Eluent B **	4.75	6.10	7.0	7.90

* 0.02 mol/L Tris + 0.15mol/L NaCl, pH = 7.0; ** 0.02 mol/L Tris + 0.15 mol/L NaCl + 10 % 异丙醇(2-propanol), pH = 7.0;
Fer: ferritin; CON: conalbumin; α-CHy-A: α-chymotrypsinogen-A

3.5 固定相表面性质的考察

理想的 SEC 除了体积排阻效应以外,生物大分子与固定相之间应无任何其它相互作用,即要求 SEC 固定相必须有足够强的亲水性,且表面呈电中性。在离子交换色谱中,溶质与固定相之间的相互作用力随流动相盐浓度的增大而减小,保留时间随盐浓度增大而减小;在疏水色谱中则随盐浓度的增大而增大。依据这一规律可以判断蛋白质与固定相之间是否存在静电或疏水相互作用力。从图 3 看出,3 种蛋白和一种肽在流动相中加入浓度为 0~0.50 mol/L 的 NaCl,保留时间几乎没有变化。这进一步证实了该填料与蛋白质之间静电作用力和疏水作用力很弱,表明所合成的填料是一种较理想的 SEC 填料。

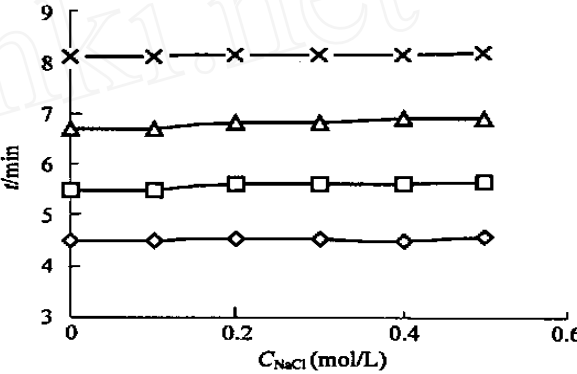


图 3 盐浓度对蛋白和肽保留的影响

Fig. 3 Effect of concentration of sodium chloride on retention of proteins and a peptide

◇. 铁蛋白 (Fer); □ 伴清蛋白 (CON); △ α糜蛋白酶原 (α-CHy-A); ×. 五肽 (five-peptide)。

3.6 SEC 柱对标准蛋白的质量和活性回收率

SEC 对蛋白的质量和活性回收率也能说明固定相表面的亲水性。表 2 是 3 种蛋白和一种肽在 SEC 上的 3 次平行测定的平均质量回收率。由表 2 可以

表 2 蛋白质在 SEC 柱上的质量回收率 (n = 3)

Table 2 Mass recovery of proteins and a peptide by using the synthesized SEC packings (n = 3)

蛋白质 Proteins	质量回收率 Recovery (%)	蛋白质 Proteins	质量回收率 Recovery (%)
铁蛋白 Fer	89.0 ±3.2	伴清蛋白 CON	91.3 ±2.5
α糜蛋白酶原 α-CHy-A	93.5 ±2.3	五肽 Five-peptide	94.1 ±2.9

看出,其质量回收率 > 89 %。这进一步表明,该合成的 SEC 固定相的非特异性吸附非常小,亲水性强。该柱对溶菌酶的活性回收率高达 98 % ±5 %。

3.7 生物大分子的体积排阻色谱分离

图 4 是铁蛋白 (Fer)、伴清蛋白 (CON)、α糜蛋白酶原 (α-CHy-A) 和五肽在改性树脂 II 上的 SEC 分离图,而蛋白在改性树脂 I 的分离性能差,质量回收率低(未附图)。3 种蛋白质和五肽的分子量依次为 440000、77000、25000 和 650 道尔顿,3 种蛋白和 1 种肽在改性树脂 II 柱上的洗脱次序与分子量

大小的次序一致,并且蛋白质和多肽的分子量($\log M$)与淋洗体积(V_e)呈线性关系。表明生物大分子在此固定相上的分离遵循体积排阻色谱分离机理。另外,从图 4 可看出,3 种蛋白和 1 种肽的色谱图峰形有一点拖尾。这是由于生物大分子的脱附动力学比小分子慢,溶质的传质也比小分子慢^[10]。因此,所分离的色谱峰有一点拖尾是正常的。

4 结 论

实验采用自己合成的单分散交联聚甲基丙烯酸环氧丙酯树脂为基质,将该基质树脂经一种新的化学方法改性后得到亲水性良好的新型体积排阻色谱固定相,用 Tris 缓冲溶液为流动相,对 3 种蛋白质和 1 种肽的分离完全遵循 SEC 色谱分离机理并取得较好的分离效果。

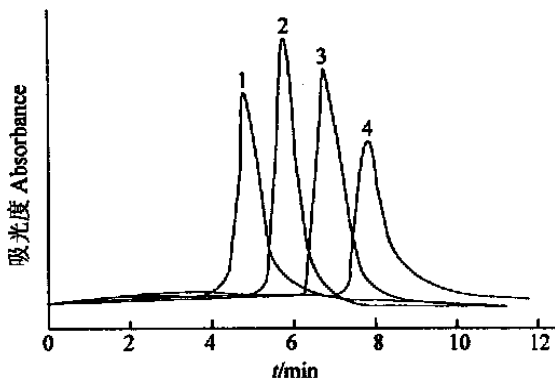


图 4 蛋白和肽在 SEC 固定相上的分离图

Fig. 4 Chromatogram of protein and peptide on the synthesized SEC packed column

洗脱剂(eluent): 0.02 mol/L Tris + 0.15 mol/L NaCl, pH = 7.0; 流速(flow rate): 0.5 mL/min; $\lambda = 280$ nm; 样品(sample): 1. 铁蛋白(Fer); 2. 伴清蛋白(CON); 3. α -糜蛋白酶原(α -Chy-A); 4. 五肽(five-peptide)。

References

- 1 Yang Y B, Regnier F E. *J. Chromatogr.*, **1991**, 544: 233~247
- 2 Yang Y B, Verzele M. *J. Chromatogr.*, **1987**, 387: 197~205
- 3 Gong B L, Ke C Y, Geng X D. *Anal. and Bioanal. Chem.*, **2003**, 375: 769~774
- 4 Ogino K J, Sato H Y, Tsuchiya K R, Suzuki H S, Moriguchi S Y. *J. Chromatogr.*, **1995**, 699: 59~66
- 5 Chang Jianhua (常建华). *Organic Analysis (有机分析)*. Xi'an (西安), Northwest University Press (西北大学出版社), **1995**: 24~35
- 6 Michel E, Goldberg R, Rainer R. *J. Biochem.*, **1991**, 30: 2790~2796
- 7 Tennikova T B, Horak D, Svec F. *J. Chromatogr.*, **1988**, 435: 357~363
- 8 Smigol V, Svec F, Frechet J M J. *Anal. Chem.*, **1994**, 66: 2129~2138
- 9 Gong B L, Shen Y H, Geng X D. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **2003**, 26(6): 945~956
- 10 Geng X D, Regnier F E. *Chin. J. Chem.*, **2002**, 20(5): 431~439

Preparation of Hydrophilic Size Exclusion Packings Using Monodisperse Poly(glycidylmethacrylate-co-ethylenedimethacrylate) Beads as Matrix and Their Application for Biopolymers Separation

Gong Bolin, Wang Chaozhan, Wang Lili, Geng Xindu*

(Institute of Modern Separation Science, Key Laboratory of Modern Separation Science in Shanxi Province, Northwest University, Xi'an 710069)

Abstract Based on monodisperse poly(glycidylmethacrylate-co-ethylenedimethacrylate) particles as a media, a new hydrophilic stationary phase for size exclusion chromatography (SEC) was synthesized by a new chemically modified method. The content of hydroxyl was measured to be 6.1 mmol/g. The modified resin was evaluated for mass recovery of proteins, hydrophilicity, rigidity, and chemical stability in detail. With trihydroxymethylaminomethane (Tris) buffer (pH = 7) as mobile phase, three kinds of proteins and a peptide were selected to test the synthesized SEC column. It was observed that it follows SEC mechanism and a satisfactory result was obtained.

Keywords Monodisperse poly(glycidylmethacrylate-co-ethylenedimethacrylate) particles, size exclusion chromatography, biopolymers

(Received 1 July 2003; accepted 19 December 2003)