

致孔剂溶解度参数对大孔层析介质的结构影响研究

兰梦菲¹ 安宁¹ 赵颖¹ 曹炜¹ 李恒¹ 赵岚² 黄永东² 张荣月^{*1}

¹(北京石油化工学院化学工程学院/燃料清洁化及高效催化减排技术北京市重点实验室, 北京 102617)

²(中国科学院过程工程研究所, 北京 100190)

摘 要 分别以甲基丙烯酸缩水甘油醚酯和乙二醇二甲基丙烯酸酯为功能单体和交联剂,采用悬浮聚合方法制备了大孔聚合物微球。考察了致孔剂的组成及用量对微球的孔径、比表面积的影响,其中随着致孔剂中的良溶剂(二氯甲烷 $\delta=9.7$ (cal/cm^3)^{1/2})和不良溶剂(正辛醇 $\delta=10.3$ (cal/cm^3)^{1/2})的比例变化,致孔剂体系溶解度参数可调范围为 $9.89 \sim 10.09$ (cal/cm^3)^{1/2},随着致孔剂与聚合物之间溶解度差值的增加,微球的孔径随之增大而比表面积呈下降趋势。将此类微球偶联聚乙炔亚胺衍生为阴离子交换层析介质,以前沿分析法比较了不同孔径的微球的传质性能,其中孔径为 257 nm 的介质仍能保持较高的动态蛋白载量 (45.1 mg/mL),表明此类大孔介质在高通量分离纯化应用方面具有很大潜力。

关键词 致孔剂; 溶解度参数; 大孔微球; 蛋白质; 分离

1 引言

人们对生物制品的需求日益增加,促使生物制药生产规模不断增加,如何高效地获得符合要求的生物产品,是下游分离纯化技术所面临的挑战,因此发展高通量的分离分析方法势在必行。层析分离作为一种主流技术在蛋白分离纯化中占有重要地位,其中色谱层析介质是分离柱的核心。当前以琼脂糖为基质的介质应用广泛,具有生物相容性好、化学稳定性高等优点,但其缺乏机械刚性、耐压性差(通常 $< 0.3 \text{ MPa}$)、孔径小^[1](孔径范围在 $3 \sim 50 \text{ nm}$ 之间),尤其在分离大尺寸生物分子,如病毒、类病毒颗粒时,表现出载量低、通量小的不足。而具有大孔结构的聚合物层析介质机械强度高(可耐受 10 MPa 以上压力)、孔径尺寸大($>100 \text{ nm}$),更适合大尺寸分子的传质,能够满足快速、高通量分离纯化的需求,可弥补这些不足^[2]。

以琼脂糖为基质的介质多以悬浮自由基聚合制备而成,控制微球结构从而获得贯通孔是制备难点。二十世纪九十年代初出现的颗粒内以对流传质为特征的灌注色谱填料(POROS 系列)^[3],其最大特点为同时具有贯通孔($500 \sim 800 \text{ nm}$)和扩散孔($20 \sim 100 \text{ nm}$),在保证蛋白分子快速传质的同时具有较高的蛋白载量。这种介质制备过程中先形成纳米粒子,然后粒子间进行团聚从而得到大孔微球,因其制孔过程复杂而难以准确控制^[4]。Sun 研究组^[5,6]采用碳酸钙颗粒和有机溶剂作为致孔剂制备超大孔 PGMA 微球,得到具有 10^2 nm 孔径微球,但由于无机颗粒与有机聚合物的相容性较差,所得微球的贯通孔不易均匀控制;Zhou 等^[7,8]研究了以反胶团溶胀法制备聚丙烯酸酯类和苯乙烯类为基质的超大孔层析介质。以上两种方法均是通过设计不同的致孔剂,从而制得贯通孔结构。该类大孔聚合物微球对蛋白大分子有着较好的传质性能,但同时其比表面积会显著降低,甚至低于 $10 \text{ m}^2/\text{g}$,介质的蛋白载量难以提升^[9,10]。本课题组前期工作中采用原子转移自由基聚合方式制备大孔聚丙烯酸酯类微球,具有 $200 \sim 300 \text{ nm}$ 的贯通孔^[11,12],同时具有较高的比表面积,在调控孔径及比表面积的过程中发现,致孔剂对于微球结构的影响最为显著,但对其影响规律未做进一步研究。

本研究仍分别以甲基丙烯酸缩水甘油醚酯和乙二醇二甲基丙烯酸酯为功能单体和交联剂,在传统悬浮聚合体系中,系统研究了致孔剂组成及用量对微球的结构包括孔径大小、比表面积、表面形貌、蛋白载量等的影响,探索了溶解度参数与微球结构之间的规律关系。

2017-10-07 收稿; 2017-11-21 接受

本文系北京市自然科学基金(No. 2162013)、北京市教委科技面上项目(No. KM201710017003)和 2017 北京高等学校高水平人才交叉培养“实培计划”项目(No. 17032021006)资助。

* E-mail: ryzhang@iccas.ac.cn

$\delta=9.7$ (cal/cm³)^{1/2}) 为良溶剂,正辛醇(OA, $\delta=10.3$ (cal/cm³)^{1/2}) 为不良溶剂,PGMA-EDMA 微球的溶解度参数参照聚甲基丙烯酸甲酯拟定为 9.3 (cal/cm³)^{1/2},以上有关溶解度参数均参照文献[15]的数值,致孔剂二者的体积组成比例分别为 2:1、1:1、1:1.5、1:2(对应的溶解度参数依次为 9.89、10.0、10.06、10.09 (cal/cm³)^{1/2}),不同比例下的表面形貌变化如图 2 所示,DCM/OA 为 2:1 时(A1 和 A2)微球表面致密,几乎无孔;当降低 DCM 用量,DCM/OA 为 1:1 时(B1 和 B2),微球表面开始变得粗糙,放大 5000 倍下的 SEM 图(B2)出现 100 nm 以内的大孔;继续降低 DCM 用量,二者比例为 1:1.5 时(C1 和 C2),微球表面的孔径增大至 200~300 nm;随着 DCM 用量进一步减少,当下降为 DCM/OA=1:2 时(D1 和 D2),微球表面粗糙度显著,大孔尺寸及数量均明显增加,孔之间的通透性增加;继续减少 DCM 的用量(DCM/OA=1:3),微球破碎严重。微球的表面形貌分析表明,不良溶剂 OA 用量的增大对形成大孔有促进作用,而良溶剂 DCM 有利于微球的成球或者机械强度的提高,此趋势与普通的多孔聚合物材料制备规律相似^[16]。

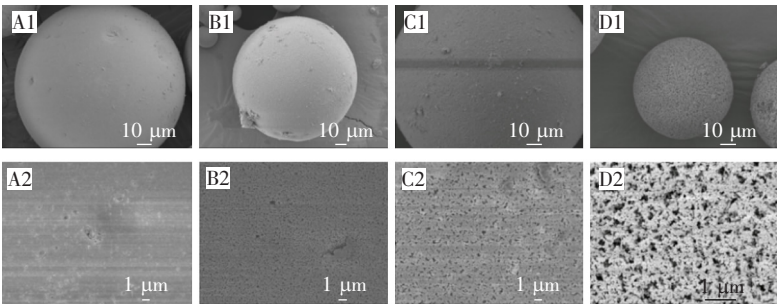


图 2 致孔剂二氯甲烷和正辛醇不同组成比下的表面形貌图,A(1,2)、B(1,2)、C(1,2)、D(1,2)对应二氯甲烷和正辛醇体积比依次为 2:1、1:1、1:1.5、1:2

Fig.2 The morphology of PGMA-EDMA microspheres by porogen with different ratios of dichloridemethylene (DCM) and octyl alcohol (OA)

A(1,2),B(1,2),C(1,2) and D(1,2)are corresponding to volume ratios of DCM and OA of 2:1, 1:1, 1:1.5 and 1:2, respectively

3.2 致孔剂体系的溶解度参数对微球内部结构的影响

不同比例的致孔剂体系的溶解度参数以及所对应微球的孔径及比表面积如表 1 所示。致孔剂体系的溶解度参数由 9.89 (Cal/cm³)^{1/2}增加到 10.09 (Cal/cm³)^{1/2}所对应的微球孔径呈增大趋势,最大平均孔径可达(257.0±0.2) nm,相反,对应的比表面积为下降趋势,从(134±1) m²/g 下降至(47±1) m²/g。通常认为聚合物的溶解度参数值与溶剂的溶解度参数值越接近时,聚合物越倾向于溶解其中^[17]。致孔剂体系与 PGMA-EDMA 微球之间的溶解度差值显示致孔剂与 PGMA-EDMA 的相容性优劣,进而影响微球的结构有一定影响,其影响见图 3 和图 4。由溶解度参数差值 $\Delta\delta$ 对孔径的影响趋势图(图 3)可见,随着差值的增加,微球孔径呈上升趋势,而其比表面积则相反呈下降趋势(图 4)。究其原因,溶解度差值 $\Delta\delta$ 越大,致孔剂与聚合物之间的相容性越差,在聚合过程中生成的聚合物与致孔剂之间的相分离发生的越早,后期聚合物在早期析出的核上继续生长,形成的聚集颗粒尺寸偏大,聚集颗粒尺寸越大则颗粒间的空隙也随之增大,因此,最后形成了较大的孔径。与此同时,聚集颗粒尺寸越大则对应的比表面积则越低,故微球的比表面积变化呈相反趋势。

表 1 致孔剂组分不同比例所得微球的孔径大小及比表面积

Table 1 The surface area and pore size of PGMA-EDMA obtained by porogen with different ratios of DCM and OA

参数 Parameter	DCM/OA (V/V)			
	2:1	1:1	1:1.5	1:2
平均孔径 Pore size* (nm)	21±0.2	73±0.2	124±0.2	257±0.2
比表面积 Surface area** (m ² /g)	134±1	91±1	67±1	47±1
溶解度参数 Solubility parameter (Cal/cm ³) ^{1/2}	9.89	10.0	10.06	10.09

* 用压汞法测定介质平均孔径; ** 用氮气吸附法测定介质比表面积

*: The average pore size is determined by mercury intrusion method; **: The surface area is measured by nitrogen adsorption method

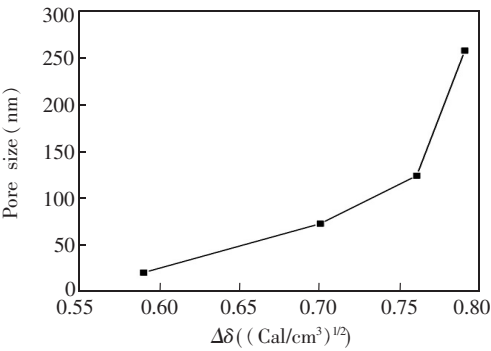


图 3 溶解度参数差值与微球孔径之间的关系图
Fig. 3 Relationship of $\Delta\delta$ and pore size of microspheres

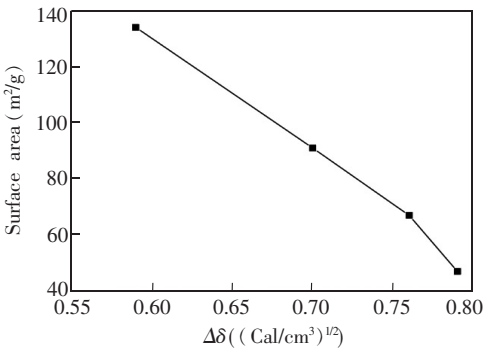


图 4 溶解度参数差值与微球比表面积之间的关系图
Fig. 4 Relationship of $\Delta\delta$ with surface area of microspheres

3.3 不同结构微球的蛋白动态载量测定

将不同孔径的微球衍生后制备得到阴离子交换介质 (PGMA-EDMA-PEI), 分别测定了其离子交换容量和动态蛋白载量值。从表 2 可见, 随着介质孔径的增加 (21 ~ 257 nm), 离子交换容量稍有下降, 主要是由于介质的比表面积降低, 致使介质表面偶联 PEI 配基的量减少, 但此影响并不显著, 介质的离子交换容量均保持在 0.35 mmol/mL 以上。可能是介质的比表面积虽然降低, 但相应的孔径的增加降低了大分子配基 PEI 的传质以及反应位阻, 故最终对偶联 PEI 的数量没有显著影响。

表 2 不同孔径结构的 PGMA-EDMA-PEI 微球的离子交换容量和动态蛋白载量
Table 2 Ion exchange capacity and dynamic binding capacity on PGMA-EDMA-PEI with different structure

参数 Parameter	DCM/OA (V/V)			
	2 : 1	1 : 1	1 : 1.5	1 : 2
平均孔径 Pore size (nm)	21±0.2	73±0.2	124±0.2	257±0.2
比表面积 Surface area (m²/g)	134±1	91±1	67±1	47±1
离子交换容量 Ion exchange capacity (mmol/mL)	0.398±0.002	0.373±0.002	0.370±0.002	0.355±0.002
动态载量 Dynamic binding capacity (mg/mL) *	61.4±0.1	50.2±0.1	48.2±0.1	45.1±0.1

* : 动态载量值为 50% 流穿值 The dynamic binding capacity was obtained by 50% breakthrough.

比较了不同孔径结构的 PGMA-EDMA-PEI 的动态载量, 通常介质孔径的增大有利于蛋白大分子的传质, 但由于比表面积降低, 蛋白载量也会降低, 从表 2 可知, 介质的动态载量随着孔径的增加呈下降趋势, 从 61.4 mg/mL 下降至 45.1 mg/mL, 下降幅度为 26.5%, 但远小于比表面积下降幅度 (64.9%), 表明此类大孔介质一定程度上能够保持较高载量。

4 结论

本研究采用悬浮聚合方法制备了甲基丙烯酸缩水甘油酯与乙二醇二甲基丙烯酸酯共聚的大孔微球, 考察了致孔剂的溶解度参数对微球结构的影响。结果表明, 随着致孔剂中不良溶剂比例的增大, 微球的孔径随之增加, 同时比表面积呈现下降趋势。致孔剂体系与聚合物之间的溶解度参数差值越小, 微球的孔径越小, 比表面积越大, 相应的蛋白载量越高。本研究为聚合物层析介质的制备提供了参考。

References

1 Josić D, Horn H, Schulz P, Schwinn H, Britsch L. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 796(2): 289–298
2 Zhang R Y, Li Q, Li J, Zhou W Q, Ye P L, Gao Y, Ma G H, Su Z G. *Mat. Sci. Eng. C*, **2012**, 32(8): 2628–2633
3 Hahn R, Schlegel R, Jungbauer A. *J. Chromatogr. B*, **2003**, 790(1): 35–51
4 Noubar B A, Brookline M, Fred E R, West L I, Robert C D, Norwich J V. US Patent, 5019270, **1991**
5 Wu L, Bai S, Sun Y. *Biotechnol. Prog.*, **2003**, 19: 1300–1306
6 Zhang M L, Sun Y. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 922(1-2): 77–86

- 7 Zhou W Q, Gu T Y, Su Z G, Ma G H. *Polymer*, **2007**, 48: 1981–1988
- 8 Zhou W Q, Gu T Y, Su Z G, Ma G H. *Eur. Polym. J.*, **2007**, 43(10): 4493–4502
- 9 Svec F, Fréchet J M J. *Chem. Mater.*, **1995**, 7: 707–715
- 10 Zhou X, Xue B, Bai S, Sun Y. *Biochem. Eng. J.*, **2002**, 11: 13–17
- 11 ZHANG Rong-Yue, PAN Yi-Ting, JI De-Kun, LIU Cai. China Patent, 20151046635465, **2015**
张荣月, 潘一廷, 冀德坤, 刘才. 中国专利, 20151046635465, **2015**
- 12 YU Tian, XU Cheng-Nan, YU Yuan, ZHAO Fei-Fei, PAN Yi-Ting, LIU Cai, HUANG Yong-Dong, ZHANG Rong-Yue. *Chem. J. Chinese Universities*, **2016**, 37(9): 1740–1743
虞天, 许成楠, 于嫒, 赵飞飞, 潘一廷, 刘才, 黄永东, 张荣月. 高等学校化学学报, **2016**, 37(9): 1740–1743
- 13 Zhang R Y, Li Q, Gao Y, Li J, Huang Y D, Song C, Zhou W Q, Ma G H, Su Z G. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1343: 109–118
- 14 YU Yuan, WU Xing-Lan, LI Yin, HUANG Yi-Kang, JIANG Cheng-Wei, ZHAO Fei-Fei, WU Jie, ZHANG Rong-Yue. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2016**, 44(12): 1874–1879
于嫒, 吴兴兰, 李尹, 黄逸康, 姜成伟, 赵飞飞, 吴颢, 张荣月. 分析化学, **2016**, 44(12): 1874–1879
- 15 LIU Yu-Tang. *Wuhan Huagong*, **1994**, (3): 1–21
柳玉堂. 武汉化工, **1994**, (3): 1–21
- 16 Wu Y G, Dicky A, Giorgio C. *J. Chromatogr. A*, **2015**, 1375: 92–100
- 17 ZHENG Yu-Ying. Preparation and Characterization of Polymer Microspheres by Disperse Polymerization. Beijing: Science Press, **2017**: 15
郑玉婴. 聚合物微球分散聚合法制备、结构及性能. 北京: 科学出版社, **2017**: 15

Effect of Porogen Solubility Parameter on Structure of Chromatographic Supports with Large Pores

LAN Meng-Fei¹, AN Ning¹, ZHAO Ying¹, CAO Wei¹, LI Heng¹, ZHAO Lan², HUANG Yong-Dong², ZHANG Rong-Yue^{*1}

¹(Beijing Key Laboratory of Fuels Cleaning and Advanced Catalytic Emission Reduction Technology/College of Chemical Engineering, Beijing Institute of Petrochemical Technology, Beijing 102617, China)

²(National Key Lab of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract The macroporous microspheres were prepared through suspension polymerization and based on a copolymer of glycidyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate. The effect of porogen on the microspheres structure was evaluated in terms of pore size and surface area. Porogen contained dichloromethane ($\delta=9.7$ (cal/cm³)^{1/2}) and *N*-octanol ($\delta=10.3$ (cal/cm³)^{1/2}) which corresponded to a good and poor solvent, respectively. The solubility parameter of porogen was controlled in the range of 9.89–10.09 (cal/cm³)^{1/2}. The pore size of microspheres increased with the difference value of solubility parameter between the polymer and the porogen. On the contrary, the surface area of microspheres decreased in this study. The anion exchange media was prepared through coupling poly(ethylene imine) in the microspheres, and the proteins transport was determined by frontal analysis method. The macroporous microspheres with 257 nm pore size could still afford a high proteins capacity (45.1 mg/mL). These macroporous supports showed a large potential in a rapid separation of proteins.

Keywords Porogen; Solubility parameter; Macroporous microspheres; Protein; Separation

(Received 7 October 2017; accepted 21 November 2017)

This work was supported by Beijing Natural Science Foundation, China (No. 2162013).