

用作亲和色谱固定相基体的二氧化锆与脲醛树脂复合物微球的合成

雷姝蕾 黄国才 杨 屹 于世林

(北京化工大学应用化学系, 北京 100029)

摘 要: 文中研究了一种用作生物大分子亲和色谱基体的二氧化锆与脲醛树脂复合物微球的制备方法。以水合氯化氧锆为起始原料, 六次甲基四胺和尿素作为沉淀剂, 在正庚烷乳液中生成 $3 \sim 5 \mu\text{m}$ 的二氧化锆与脲醛树脂复合物微球。探讨了乳化剂和乳化助剂的种类、比例、搅拌速度等对复合物微球球径的影响。

关键词: 亲和色谱固定相基体; 二氧化锆-脲醛树脂; 复合物微球

中图分类号: O 657.7

引 言

当前, 随着生物工程技术的迅速发展, 人们对多肽、蛋白质、DNA、RNA 等生物大分子的研究兴趣日益增加。这些生物大分子既是生化药品、发酵产品、生物体液中具有特殊生物活性的主体成分, 又是生物工程中进行蛋白质纯化、DNA 重组、修复和转录技术中的重要研究对象。

生物大分子具有复杂的柔性结构, 其相对分子质量也非常大, 它们在溶液中的扩散系数都比较小, 粘度较大, 易受外界温度、pH、有机溶剂的影响而发生变性, 并引起结构的改变^[1]。生物大分子的上述特性使它们的色谱分离行为都远离理想情况, 对实现其高效液相色谱 (HPLC) 分离带来了实际困难, 因此解决它们的分离和分析问题, 就成为高效液相亲和色谱分析中最有挑战性课题之一^[2]。

1987 年, S. Ohlson^[3]提出的高效液相亲和色谱 (HPLAC) 分析技术至今已经获得迅速发展, 在解决生物分子分析问题上发挥了重要作用。HPLAC 分析中获得的高柱效和高分离度, 主要因为使用了大孔 ($30 \sim 50 \text{ nm}$), 单分散刚性微球 (约 $10 \mu\text{m}$), 其基体为 SiO_2 或高交联度苯乙烯和二乙烯基苯共聚物。近年为适应分析生物大分子的需求, 已研制出孔径增大至 $100 \sim 500 \text{ nm}$ 的流通粒子填料用于灌注色谱

中^[4], 但仍然未能排除生物大分子因柔韧结构在基体大孔内的滞留而产生不希望的分子间相互作用, 其后果不仅产生峰形扩散而降低柱效, 还会显著损失生物大分子的生物活性和回收率。

为了克服全多孔刚性基体用于生物大分子分析的不足之处, 80 年代中期开始, 色谱工作者又转向采用非多孔 $2 \sim 5 \mu\text{m}$ 刚性 SiO_2 或苯乙烯-二乙烯基苯共聚微球作为基体, 制成薄壳型固定相^[5~7]。此类基体由于不存在颗粒内部空隙的质量传递, 仅在表面有短的扩散路程, 因此对具有低扩散性的生物大分子产生快速的质量传递, 从而缩短滞留时间, 利于保持生物大分子高的生物活性和回收率^[8]。

非多孔基体也存在两个明显不足之处: (1) 由于仅具有较低的表面积, 从而使色谱柱柱容量较低; (2) 由于基体粒度的减少, 会使色谱柱具有高的柱压力降^[9]。

为了克服上述不足之处。本文提出一种非多孔基体——具有广泛 pH 值稳定性的二氧化锆与脲醛树脂复合物微球。此基体具有的优点为: (1) 基体为非多孔刚性微球, 可缩短生物大分子的滞留时间; (2) 基体表面具有酰胺基, 可偶联上星型辐射间隔臂以增大配位体容量。

1 实验部分

1.1 试剂

六次甲基四胺 $[(\text{CH}_2)_6\text{N}_4]$ (HMTA); 尿素 $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$; 水合氯化氧锆 $[\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}]$; Span85、Tween80、Span80、正丁醇; 无水乙醇; 正庚烷; 丙酮

收稿日期: 1999-10-08

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (A 类, 29775005)

第一作者: 女, 1976 年生, 研究生; 联系人: 于世林

(以上各种试剂皆为化学纯)。

1.2 仪器

山东电讯七厂 GNP-84-02 型磁力恒温搅拌器;铜水浴锅;滴定管;贝克曼温度计;BAUSCH & LOMB (USA) Micro Zoom™ 型金相显微镜;CAMBRIDGE INSTRUMENTS S250M K3 型扫描电子显微镜。

1.3 制备方法

取正庚烷 200 mL, 加入 5.0 g Span85, 5.0 g Span80, 0.5 g Tween80, 正丁醇 10 g, 均匀混合得到油相。向油相中缓慢滴加一定量的 2.35 mol/L ZrOCl_2 水溶液。控制一定的搅拌速度, 搅拌 15 min。然后向油相中滴加少量 3.5 mol/L 六次甲基四胺 (HMTA) 水溶液和 8 mol/L 尿素水溶液的混合物。此时油相中有凝胶状沉淀生成, 形成乳状液。稍稍降低搅拌速度, 搅拌 2 min 后快速滴加其余部分六次甲基四胺和尿素混合溶液。提高搅拌速度, 搅拌 15 min。上述操作过程温度保持在 50 。

停止搅拌后, 反应液分层, 除去上层油相。向凝胶状沉淀中加入丙酮洗涤, 沉淀由凝胶状变为颗粒状。再用丙酮洗两次, 乙醇洗三次, 去离子水洗一次。在氨水中浸泡 12 h 后用去离子水洗涤至流出液呈中性后烘干。

此方法制备得到的不同粒径的二氧化锆与脲醛树脂复合物微球的扫描电镜照片如图 1, 2, 3, 4。

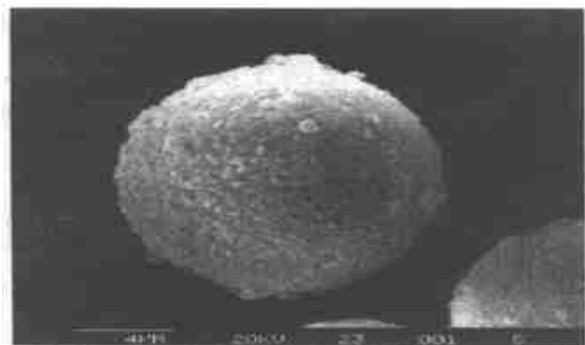


图 1 15 μm 复合物微球

Fig. 1 15 μm composite microspheres

2 结果与讨论

2.1 二氧化锆与脲醛树脂复合物微球的合成机理

二氧化锆与脲醛树脂复合物微球的合成可分为三部分。

2.1.1 二氧化锆的生成 六次甲基四胺 (HMTA) 是一种弱碱, 可水解, 其反应可表示为:

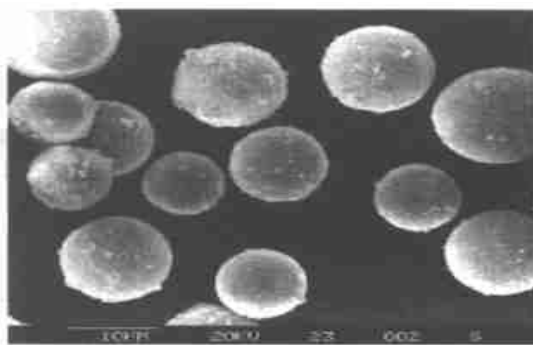


图 2 10 ~ 12 μm 复合物微球

Fig. 2 10 ~ 12 μm composite microspheres

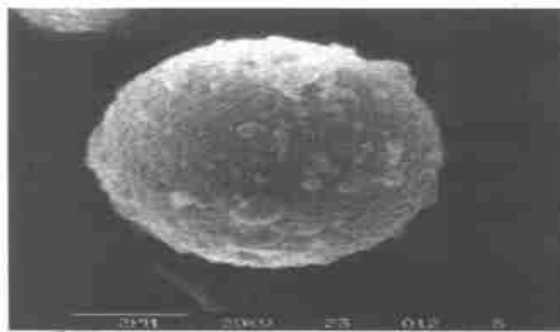


图 3 7 μm 复合物微球

Fig. 3 7 μm composite microspheres

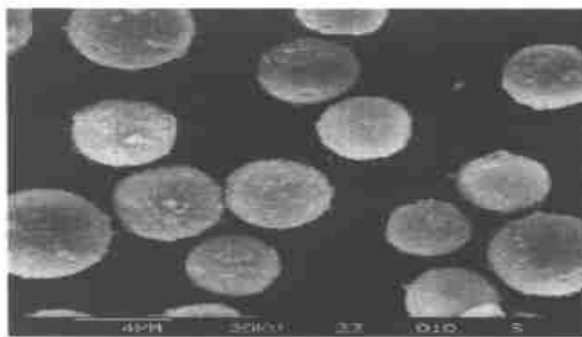


图 4 3 ~ 5 μm 复合物微球

Fig. 4 3 ~ 5 μm composite microspheres

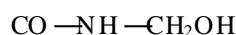


室温下氯化氧锆溶于水后, 生成酸性很强的锆盐溶液。加入 HMTA 时, 其水解生成的氨使 pH 值增大, 形成白色凝胶状 $\text{ZrO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 沉淀。此沉淀以多聚体形式存在^[10], 干燥后易形成多孔产品。

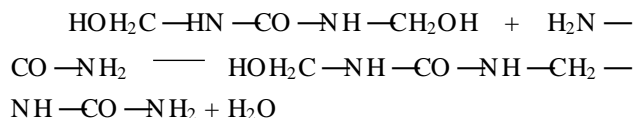
2.1.2 脲醛树脂的合成^[11]

(A) 羟甲基化反应

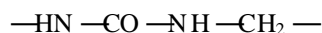




(B) 缩聚反应



进一步缩聚生成更长的链,其基本单元是



2.1.3 复合物的生成 尿素水解



其生成的 NH_3 与氯化氧锆反应生成无定形的二氧化锆沉淀(如 3.1.1 所述)。同时六次甲基四胺水解生成的甲醛与部分未水解的尿素生成了脲醛树脂(如 3.1.2 所述)。二氧化锆由乳化剂包围着分散在有机相中形成溶胶。无定形的二氧化锆沉淀多为纳米级疏松多孔粒子。由于乳化剂(表面活性剂)的存在大大降低了其界面张力,致使当向有机相加入六次甲基四胺和尿素后逐渐生成的树脂可充填到二氧化锆粒子的空隙中形成较大粒径的凝胶颗粒,并在很大程度上减少复合物微球的孔隙度。当一定粒径的氧化锆与脲醛树脂的复合物微球生成后,其表面存在的酰胺基可直接偶联星型辐射状间隔臂。

2.2 影响复合物微球球径的因素

2.2.1 乳化剂种类和配比 乳化液之所以稳定是因为加入了作为乳化剂的表面活性剂,降低了溶液的界面张力,生成了具有一定结构及机械强度的界面膜,且使得液滴面带有正电荷。这使得界面自由能变小,聚结倾向减小,系统稳定。对不同类型的乳化体系(W-O 或 O-W)选择合适的乳化剂,是制备乳化液的关键,通常形成 W-O 型乳化液的 HLB 值应为 3~8 之间。笔者选择 HLB 值为 1.8 的表面活性剂 Span85,HLB 值为 4.5 的 Span80,并配以正丁醇和少量的 Tween80 乳化助剂。通过调节它们的含量,使其 HLB 总值为 3.7,以形成 W-O 型乳化液并达到乳化效率最高^[12,13],其中正丁醇的加入是为了减少粒子团聚程度。

2.2.2 油相中锆盐、尿素、六次甲基四胺(HMTA)的浓度 从理论上讲,油相中反应物的浓度 c 越小,则它们在油相中越分散,得到的复合物微球的球径越小。实验结果证实了此结论(见表 1)。

2.2.3 搅拌速度 形成乳化液后,反应生成的微小粒子的聚合范围,限制在液滴内。控制乳化液滴的大小,可以控制球径的大小。所用的油相正庚烷密度较小(0.68 g/cm^3),而锆盐水溶液密度较大(1.4

g/cm^3),是造成静置时乳化液很快分层的主要原因,需要用搅拌来保持高分散度,以分散乳化液,所以控制搅拌速度是一重要条件。实验证明,不同的搅拌速度将得到不同球径的复合物微球。搅拌速度大则球径小,反之球径大。

表 1 油相中反应物的浓度对复合物微球直径的影响

Table 1 The effects of the concentration of reactant in oil phase on the diameter of composite microspheres

$c(\text{氯化氧锆})$ / (mol L^{-1})	$c(\text{尿素})$ / (mol L^{-1})	$c(\text{HMTA})$ / (mol L^{-1})	直径 D / μm
0.294	0.137	0.355	10~15
0.209	0.094	0.245	7~8
0.105	0.047	0.123	3~5

2.2.4 反应物的滴加速度 氯化氧锆的滴加速度 v 则是控制球径大小的另一主要因素。它的滴加速度越慢,球径越小。尿素、六次甲基四胺溶液的滴加速度对球径影响较小,一般保持在 0.04 mL/s 。表 2 说明了油相中反应物浓度一定时,氯化氧锆的滴加速度对球径的影响。

表 2 氯化氧锆的滴加速度对复合物微球直径的影响

Table 2 The effects of the dropping velocity of zirconyl chloride on the diameter of composite microspheres

	$v/(\text{mL s}^{-1})$	$D/\mu\text{m}$
1	0.016 67	~15
2	0.01	7~8
3	0.006 7	3~5

2.3 洗涤

制备得到的复合物微球表面带有的表面活性剂,必须彻底除去。本文使用丙酮有机溶剂洗涤复合物微球,并利用浓氨水与表面活性剂发生皂化作用来除净其表面带有的活性剂。另一方面,在制备复合物微球时,团聚是一个必须解决的问题,软团聚体尚可在压制过程中破坏,而硬团聚体则常常保留在粉体中,影响微粒的均一性。本文采用乙醇洗涤消除团聚^[14]。

3.4 用作基体的 3~5 μm 的复合物微球的合成最佳条件

氯化氧锆的浓度为 0.105 mol/L 、滴加速度 $0.006 7 \text{ mL/s}$;尿素溶液浓度为 0.047 mol/L ;六次甲基四胺(HMTA)浓度为 0.123 mol/L ;以正庚烷

作油相, Span80 质量浓度为 0.02 kg/L; Tween80 质量浓度为 0.002 kg/L; Span85 质量浓度为 0.02 kg/L; 正丁醇质量浓度为 0.04 kg/L; 温度 50 。

3 结 论

(1) 在 W-O 型乳化液中制备得到的二氧化锆与脲醛树脂复合物微球分散性好, 球形规整, 为非多孔实心球。球径为 5 μm 的复合物微球的密度为 1.3 g/mL, 比表面积为 0.46 m^2/g 。其耐 pH 值范围宽, 机械强度高, 符合作为亲和色谱固定相的基本要求。

(2) 乳化剂和乳化助剂种类及配比、搅拌速度、反应物浓度, 洗涤方法为得到均一复合物微球的重要条件。

参 考 文 献

- [1] 陈琼华. 生物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1989
- [2] Lundell N. A Peptide in a haystack-strategies for a biochromatographer. LC-GC INT, 1995, 8(11): 636
- [3] Ohlson S, Hansson L, Larsson P, et al. High performance liquid affinity chromatography (HPLAC) and its application to the separation of enzymes and antigens. FEBS Letter, 1978, 93: 5
- [4] Afeyan N B, Fulton S P, Reghier F E, et al. Perfusion chromatography: A approach to purifying biomolecules. Bio/ Technology, 1990, 8(3): 203
- [5] Kalghatgi K. Micropellicular stationary phase for rapid protein analysis by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr, 1990, 499: 26
- [6] Cheen H, Hirvath Cs. High-Speed high performance liquid chromatography of peptides and proteins. J Chromatogr A, 1995, 705: 3
- [7] Lee W C, Lin C H, Ruaan R C, et al. High-Performance affinity chromatography of protein on polystyrene beads. J Chromatogr A, 1995, 704: 307
- [8] Hanson M, Unger K K. Evaluation of advance silica packing Part I: Synthesis and characterization of non-porous silica Particles for HPLC. LC-GC INT, 1996, 9(10): 605
- [9] Hanson M, Unger K K. Evaluation of advanced silica packing Part II: Application of non-porous silica particle for HPLC. LC-GC INT, 1996, 9(11): 74
- [10] Sun L, Annen M J, Lorenzan-Porras C F, et al. Synthesis of porous zirconia spheres for HPLC by polymerization-induced colloid aggregation (PICA). J Colloid Interface Sci, 1994, 163: 464
- [11] 陈冠荣. 化工百科全书. 北京: 化学工业出版社, 1990
- [12] 沈钟, 王果庭. 胶体化学. 北京: 化学工业出版社, 1997
- [13] 郑忠, 胡纪华. 表面活性剂的物理化学原理. 广州: 华南理工大学出版社, 1995
- [14] 陈少贞, 陈森凤. 湿化学制备 ZrO_2 超细粉的团聚机理、表征及控制. 材料导报, 1996(3): 39

Preparation of composite microspheres of zirconia and urea-formaldehyde used as stationary phase matrix for affinity chromatography

L EI Shu-lei HUANG Guo-cai YANG Yi YU Shi-lin

(Department of Applied Chemistry, BeiJing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The synthesis of composite microspheres of zirconia and urea-formaldehyde (UF) resin with diameter between 3 and 5 μm used as stationary phase matrix for affinity chromatography was studied. With zirconyl chloride as starting material, hexamethylenetetramine (HMTA) and urea as precipitant, the composite microspheres of zirconia and UF resin was obtained in the heptane oil emulsion. The effects of the variety and ratio of emulsifier and auxiliary emulsifier, the stirring velocity, the concentration, and the dropping velocity of zirconyl chloride on the diameter of these composite microspheres were discussed.

Key words: stationary phase matrix of affinity chromatography; zirconia-urea-formaldehyde resin; composite microspheres