2024 年 4 月 色 谱 Vol.42 No.4
April 2024 Chinese Journal of Chromatography 360~367

研究论文 DOI: 10.3724/SP.J.1123.2023.11003

接枝多胺聚合物制备大孔阴离子交换色谱介质及其蛋白吸附行为评价

姜泽平[1], 郭 旺[1], 李子炀[1], 侯恒扬[1], 霍文迪[1], 王佳一[1], 马 磊[1], 靳海波[1], 黄永东[2], 张荣月[1*]

(1. 北京石油化工学院新材料与化工学院, 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生化工程国家重点实验室, 北京 100190)

摘要:以环氧活化聚甲基丙烯酸酯大孔微球(FastSep-epoxy)为基质,通过接枝聚(烯丙基胺)(PAA)制备了大孔阴离子交换色谱介质(FastSep-PAA)。考察了介质的合成条件对离子交换容量(IC)及蛋白结合容量的影响,发现 IC 随 PAA 浓度、反应时间和溶液 pH 的增加均表现为增长趋势;同时结合蛋白吸附容量的变化选择了最优合成条件。通过扫描电子显微镜观察介质的表面形貌,发现其孔隙连通性较好,且接枝前后介质孔道结构无明显变化,PAA 配基密度对介质结构无明显影响。此外,通过压汞法和氮气吸附法测定接枝前后不同介质的孔径尺寸和孔径分布情况,并考察该类介质的孔径与蛋白吸附行为的关系,发现其蛋白结合容量未出现随介质孔径尺寸增加而显著下降的现象,且孔径尺寸增加更有利于蛋白在介质内部传质。在 126 cm/h的流速下 FastSep-PAA 介质的原始孔径(即 FastSep-epoxy 的孔径)为 400 nm 时的蛋白动态结合容量(DBC)最高(70.3 g/L),该孔径下介质比表面积大,蛋白可吸附位点较多;原始孔径为 700 nm 及以下的介质蛋白 DBC 均随流速增加而均有一定下降;原始孔径为1 000 nm 的介质蛋白 DBC 几乎不受流速影响,流速由 126 cm/h增加至 628 cm/h时蛋白 DBC 仅下降 3.5%,且在 628 cm/h 的流速下能保持 57.7 g/L ,蛋白分子在该孔径下的扩散速率受限较小,传质性能优异,这一特性表明该类大孔聚合物阴离子交换色谱介质在蛋白高通量分离中具有较大的优势。

关键词:大孔聚合物微球;阴离子交换色谱介质;接枝法;蛋白结合容量

中图分类号:O658 **文献标识码**:A

Preparation of a macroporous anion exchange chromatographic medium by polyamine grafting and evaluation of its protein-adsorption behavior

JIANG Zeping[1], GUO Wang[1], LI Ziyang[1], HOU Hengyang[1], HUO Wendi[1], WANG Jiayi[1], MA Lei[1], JIN Haibo[1], HUANG Yongdong[2], ZHANG Rongyue[1*]

(*1. College of New Materials and Chemical Engineering, Beijing Institute of Petrochemical Technology, Beijing Key Laboratory of Fuel Cleanliness and Efficient Catalytic Emission Reduction Technology Beijing 102617, China; 2. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

Abstract: The macroporous anion exchange chromatographic medium (FastSep-PAA) was prepared through grafting polyallylamine (PAA) onto polyacrylate macroporous microspheres (FastSep-epoxy). The effects of the synthesis conditions, including the PAA concentration, reaction time, and reaction solution pH, on the ion exchange (IC) of the medium were investigated in detail. When the PAA concentration, reaction time, and reaction solution pH were increased, the IC of the medium increased, and optimal synthesis conditions were then selected

收稿日期:2023-11-02

* **通讯联系人**.Tel:(010)81292130,E-mail:zhangrongyue@bipt.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金(22074148);国家重点研发计划课题(2021YFC2103401).

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 22074148); National Key R&D Program of China (No. 2021YFC2103401).

in combination with changes of protein binding capacity. A scanning electron microscope was used to examine the surface morphology of the medium. The medium possessed high pore connectivity. Furthermore, the pore structure of the medium was preserved after the grafting of PAA onto the macroporous microspheres. This finding demonstrates that the density of the PAA ligands does not appear to have any discernible impact on the structure of the medium; that is, no difference in the structure of the medium is observed before and after the grafting of PAA onto the microspheres. The pore size and pore-size distribution of the medium before and after grafting were determined by mercury intrusion porosimetry and the nitrogen adsorption method to investigate the relationship between pore size (measured in the range of 300-1 000 nm) and protein adsorption. When the pore size of the medium was increased, its protein binding capacity did not exhibit any substantial decrease. An increase in pore size may hasten the mass transfer of proteins within the medium. Among the media prepared, that with a pore size of 400 nm exhibited the highest dynamic-binding capacity (DBC: 70.3 g/L at 126 cm/h). The large specific surface area of the medium and its increased number of protein adsorption sites appeared to positively influence its DBC. When the flow rate was increased, the protein DBC decreased in media with original pore sizes of less than 700 nm. In the case of the medium with an original pore size of 1 000 nm, the protein DBC was independent of the flow rate. The protein DBC decreased by 3.5% when the flow rate was increased from 126 to 628 cm/h. In addition, the protein DBC was maintained at 57.7 g/L even when the flow velocity was 628 cm/h. This finding reveals that the diffusion rate of protein molecules at this pore size is less restricted and that the prepared medium has excellent mass-transfer performance. These results confirm that the macroporous polymer anion exchange chromatographic medium developed in this study has great potential for the high-throughput separation of proteins.

Key words: macroporous polymer microspheres; anion exchange chromatographic media; grafting; binding capacity of proteins

生物技术的快速发展和人们近年来对生物药物需求的增加,促进了生物制药规模的迅速增长。生物制药上游制备规模的增加对下游的分离纯化技术提出了新的挑战,色谱技术作为当前主流的分离纯化技术[1],色谱介质的性能起到决定性作用,其中高通量是色谱介质的重要参数[2]。当前常用的色谱介质多以琼脂糖为基质,其本身质地软(耐压< 0.3 MPa)、平均孔径小(30~50 nm)[3],在高通量分离纯化应用中受到一定限制。为弥补琼脂糖基质色谱介质的这一不足,近年来以有机聚合物为基质的色谱介质受到越来越多的关注,如以聚苯乙烯[4]和聚丙烯酸酯类[5]微球为基质的色谱介质机械强度高,耐压性可高达 10 MPa[6],同时其孔径调控范围广(100~1 000 nm)[7],能更好地满足高通量分离纯化的需求。

聚合物基质的色谱介质在机械强度和孔径尺寸方面弥补了常规琼脂糖色谱介质的不足,但因为其本身孔径尺寸大、比表面积低等特点,致使其蛋白结合容量低[8],尤其对于大孔聚合物色谱介质来说更是如此。为提高介质吸附容量,在微球表面接枝聚合物配基是常用策略,利用该类分子的功能基团数目多、分子构象多变等特性,可提高蛋白分子的捕获效率。如本研究小组曾以支化的聚乙烯亚胺(PEI)为配基[9]制备了阴离子交换色谱介质,PEI 分子具

引用本文:姜泽平,郭旺,李子炀,侯恒扬,霍文迪,王佳一,马磊,靳海波,黄永东,张荣月. 接枝多胺聚合物制备大孔阴离子交换色谱介质及其蛋白吸附行为评价. 色谱,2024,42(4):360-367.

JIANG Zeping, GUO Wang, LI Ziyang, HOU Hengyang, HUO Wendi, WANG Jiayi, MA Lei, JIN Haibo, HUANG Yongdong, ZHANG Rongyue. Preparation of a macroporous anion exchange chromatographic medium by polyamine grafting and evaluation of its protein-adsorption behavior. Chinese Journal of Chromatography, 2024, 42(4): 360-367.

有多个氨基基团,增加了大孔聚丙烯酸酯微球表面的氨基数量,同时 PEI 长链分子通过“链传递”机理[10]进一步提高了蛋白大分子在介质内部的传质,从而增加蛋白的结合容量和传质速率。聚(烯丙基胺)(PAA)作为聚合物配基,其具有直链结构,所带氨基均为伯胺基团,这较 PEI 配基的支链结构更为简单,所带氨基种类也更为单一,因此更适合用于对阴离子交换配基的吸附与色谱行为进行系统研究[11-18]。目前该配基在琼脂糖类色谱介质上已有应用,孙彦课题组曾对不同相对分子质量的 PAA 配基接枝介质的吸附与色谱行为进行系统研究[19-21],其中 17.5 kDa 的 PAA 配基获得了更高的吸附容量与传质性能,其蛋白结合容量比接枝 PEI 的介质提高 20% 以上,远超其他类型的阴离子交换色谱介质。但以大孔聚合物微球为基质的该类色谱介质的研究目前较少,其制备方法、配基类型、蛋白吸附行为等研究内容有待深入探究。

本工作以大孔聚丙烯酸酯类微球为基质,通过“ grafting to ”方法接枝 PAA 配基制备了大孔阴离子交换色谱介质(FastSep-PAA),研究了以 PAA 为配基的阴离子交换色谱介质的制备方法,探讨了配基密度、孔径尺寸与蛋白结合容量的关系,为该类聚合物色谱介质的制备和应用提供一定的理论参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

扫描电子显微镜(SEM),韩国 COXEM 公司;TG 16 台式高速离心机(TMHSC),上海卢湘仪离心机仪器有限公司;全自动比表面及孔径分析仪(BET),金埃谱(南京)科技有限公司;高性能全自动压汞仪(MIP),深圳华普通用科技有限公司;SCG-100 型蛋白色谱仪,苏州赛谱仪器有限公司;L5 紫外可见分光光度计(UV-Vis),上海仪电分析仪器有限公司;SHA-BA 型水浴恒温振荡器(IS),金坛市荣华仪器制造有限公司;E1677 垂直混合仪(VM),宁波新芝生物科技股份有限公司。

环氧活化聚甲基丙烯酸酯大孔微球(FastSep-epoxy,其微球表面为环氧基团)定制于北京博尔赛谱生物科技有限公司,牛血清白蛋白(BSA,纯度 98%)购于北京百灵威科技有限公司,PAA(分子质量 10~20 kDa,纯度 98%)购于北京华威锐科化工有限公司,以上试剂使用前均未进一步纯化。

1.2 大孔微球表面接枝 PAA

大孔阴离子交换色谱介质的制备过程如下:将 4.0 g PAA 溶解于 20 mL 去离子水中,用 0.5 mol/L NaOH 调节 pH = 12.0,将 2.0 g 干燥恒重的大孔微球 FastSep-epoxy 一并加入 50 mL 离心管中,于垂直混合仪上室温反应 12 h,反应完毕后,将制得的微球用去离子水洗涤至中性,于 25 ℃真空干燥 24 h 后室温存放备用,将其命名为 FastSep-PAA(依据原料微球的厂家标示孔径,分别命名为 FastSep-PAA-300、400、500、700、1000)。

1.3 FastSep-PAA 容量

1.3.1 离子交换容量(IC)

量取 10 mL FastSep-PAA 加入色谱柱中,将 50 mL 1 mol/L NaOH 加入色谱柱内,自然流尽后用去离子水洗涤至中性,准确量取 40 mL 0.1 mol/L HCl 加入色谱柱内,收集流出液并用 50 mL 1 mol/L NaCl 洗涤收集,在流出液中滴加 1~2 滴酚酞指示剂,用 0.1 mol/L NaOH 进行滴定,至溶液由无色变为粉色,记录滴定所消耗的 NaOH 溶液体积,按式(1)计算离子交换容量:

$$IC = \frac{V_{HCl}c_{HCl} - V_{NaoH}c_{NaOH}}{V_{球}} \quad (1)$$

式中:V_{HCl}为 HCl 溶液体积,mL; c_{HCl}为 HCl 溶液浓度,mol/L; V_{NaoH}为 NaOH 溶液体积,mL; c_{NaOH}为 NaOH 溶液浓度,mol/L; $V_{球}$为微球体积,mL。

1.3.2 蛋白静态结合容量(SBC)

将一定量的 FastSep-PAA 与 BSA 溶液(该溶液用 50 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液配制)混合,室温吸附 6 h,离心后取上清液,用紫外可见分光光度计在 280 nm 波长下测定其吸收值,通过标准曲线计算剩余蛋白浓度 $C_{剩余}$,按式(2)计算蛋白静态结合容量:

$$SBC = \frac{(C_{初始} - C_{剩余})V_{BSA}}{V_{球}} \quad (2)$$

式中:$C_{初始}$为初始 BSA 溶液的质量浓度,g/L; $C_{剩余}$为剩余 BSA 溶液的质量浓度,g/L; V_{BSA}为 BSA 溶液体积,mL。

1.3.3 蛋白动态结合容量(DBC)

将介质装填于聚丙烯色谱柱(Φ 7.8 mm×13 mm)中,以 50 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲溶液作为平衡缓冲溶液,1 mol/L 氯化钠溶液作为洗脱液(该溶液用 50 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 缓冲溶

液配制），先用平衡缓冲液将色谱柱平衡至基线平稳，之后切换进样阀至蛋白溶液（2 g/L BSA 溶液）进行液体自动进样，当流穿曲线高度达到最高点后停止进样，先用平衡缓冲溶液冲洗色谱柱至基线重新平稳，然后用洗脱液对蛋白进行洗脱，记录 10% 流穿体积，按式（3）计算蛋白动态结合容量：

$$DBC = C_{BSA} V_{10\%\,流穿} / V_{球} \quad (3)$$

式中：C_{BSA} 为进样蛋白的质量浓度，g/L；$V_{10\%\,流穿}$ 为 10% 流穿体积，mL。

1.4　介质结构及孔径尺寸测定

介质的表面形貌结构通过 SEM 进行观察；其比表面积分析采用氮气吸附法测定；采用压汞法对介质孔径尺寸和分布进行表征。

2　结果与讨论

2.1　反应条件对介质 IC 及蛋白 SBC 的影响

2.1.1　PAA 浓度

以 FastSep-epoxy 为基质，通过微球表面的环氧基与 PAA 分子的伯氨基反应，将 PAA 分子接枝至大孔微球表面，制备得到 FastSep-PAA，其制备过程如图 1 所示。

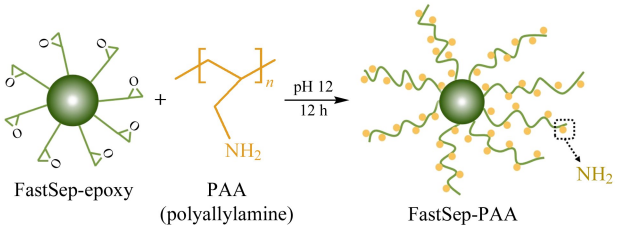


图 1　FastSep-PAA 的制备过程

Fig. 1　Scheme for preparation of FastSep-PAA

介质表面氨基数量决定其表面吸附位点数量，故首先考察了 PAA 质量浓度（C_{PAA}）对蛋白静态结合容量的影响，其结果如图 2 所示。随着 C_{PAA} 的增加，IC 增加，SBC 先增加后不变。在 C_{PAA} 小于 0.05 g/mL 时，IC 较低，蛋白吸附位点较少，故 SBC 较低；增加 C_{PAA}，IC 增高，蛋白吸附位点增多，蛋白结合能力增加，C_{PAA} 为 0.2 g/mL 时 SBC 达到最高值（101.3 g/L）；继续增加 C_{PAA}，IC 继续增加，但 SBC 不再随之增加。类似规律出现在李明等[19]的研究中，该研究将 17.5 kDa 的 PAA 分别接枝到琼脂糖介质（Sepharose FF）上，制备得到一系列不同 IC 的阴离子交换色谱介质（Sepharose FF-PAA-S），分别考察了 IC 对蛋白 SBC 的影响，发现随 IC 增加，

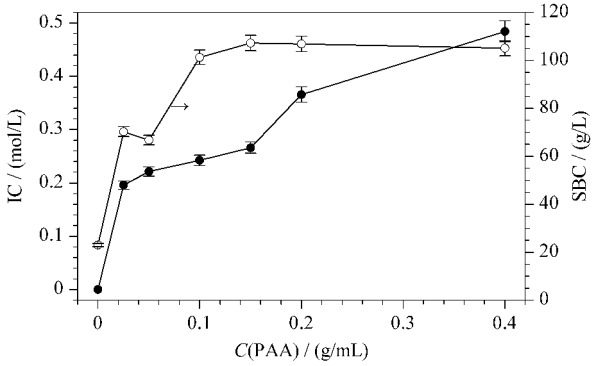


图 2　PAA 质量浓度对介质 IC 和蛋白 SBC 的影响（n=3）

Fig. 2　Effect of mass concentration of PAA (C_{PAA}) on ion exchange capacity (IC) of media and static binding capacity (SBC) of protein (n=3)

蛋白吸附位点增加，蛋白 SBC 增加；此外，链伸展程度增加、链间距减小会使蛋白 SBC 快速增加，而孔隙体积减小则会使蛋白 SBC 降低。所以随着 C_{PAA} 的增多，微球内部分孔隙体积被占据，空间位阻逐渐增大，蛋白的可及孔隙空间减小[14,19]，故随配基密度增加 SBC 基本保持不变，所以在后续实验中不再继续增加 PAA 浓度，选择 0.2 g/mL 为最优单体浓度。

2.1.2　反应时间

反应时间对介质 IC 及蛋白 SBC 的影响规律如图 3 所示，考察范围为 0.5～48 h，随着反应时间的增加，IC 先增加后逐渐稳定，而 SBC 则略有下降。根据 IC 随反应时间的变化趋势，可以将反应时间分为 3 个阶段（反应初期、反应中期和反应末期）。在反应初期（3 h 内），微球表面富含环氧基，PAA 的接枝速率快，IC 随时间增加而迅速增加（3 h 时达到 0.31 mol/L）；在反应中期（3～12 h），微球表面的环氧基逐渐减少，PAA 接枝速率降低，IC 随时间增加

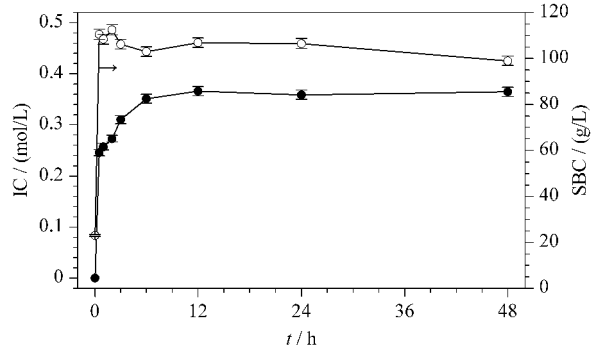


图 3　反应时间对介质 IC 和蛋白 SBC 的影响（n=3）

Fig. 3　Effect of reaction time on media IC and protein SBC (n=3)

而缓慢增加(12 h 时达到 0.37 mol/L);在反应末期(12~48 h),微球表面的环氧基几乎完全被反应掉,PAA 不再继续增加,IC 随时间增加而基本保持不变(48 h 时保持在 0.37 mol/L)。随着反应时间的增加,接枝的 PAA 链不断增多,互相缠绕,造成了微球内部分孔隙体积被占据,孔内空间位阻逐渐增大,蛋白的可及孔隙空间减小[15],故 SBC 稍有下降(0.5 h 时 110.5 g/L, 48 h 时 99.0 g/L)。因此,为了获得最佳的接枝效果,需要选择合适的反应时间,通过比较不同反应时间下的 SBC 和 IC,找到最佳的反应时间。在接枝 PAA 单体的过程中当反应时间为 12 h 时,SBC 达到最高,故选择 12 h 作为最优反应时间。

2.1.3 pH 值

反应溶液的 pH 值影响 PAA 中氨基的质子化程度,进而影响其反应效率,通过考察 pH 7~14 范围内 IC 和 SBC 的变化(如图 4 所示),发现二者都随着 pH 升高先增加后减小,在 pH 12 时为最大值,IC = 0.37 mol/L, SBC = 106.86 g/L。pH 对环氧基的反应活性和氨基质子化程度有较大影响,其影响规律[9]如下:环氧基本身存在较大角张力,性质活泼,易于发生亲核取代反应而开环,在碱性条件下,亲核试剂优先进攻取代较少的碳原子,反应较容易发生;在酸性条件下,亲核试剂优先进攻取代较多的碳原子,反应位阻大从而较难反应。PAA 是直链碱性聚电解质,$pK_a = 9.67$[22]。当 pH<9.67 时,PAA 链上的氨基质子化,即以 $-NH_3^+$ 和 $-NH_2^+$ 形式存在,接枝 PAA 后的微球与游离的 PAA 之间静电斥力增加,PAA 接枝效率低;当 pH > 9.67 时,PAA 链上的氨基脱质子化,即以 $-NH_2$ 形式存在,游离的 PAA 在微球中的扩散不受限制,PAA 接枝效率高[22]。此外,继续增加 pH 值,会增加微球上环氧基水解的反应速率[5],导致接枝效率降低,因此存在最优 pH 值(pH 12)。

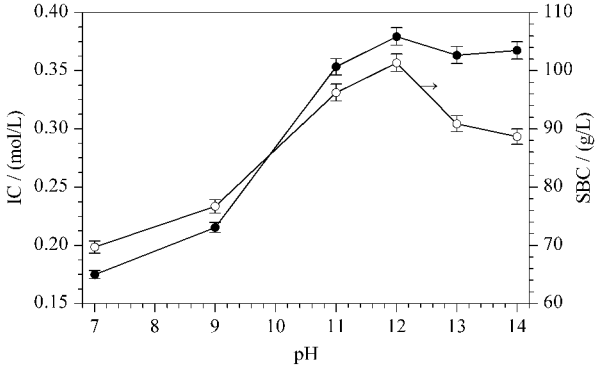


图 4 pH 对介质 IC 和蛋白 SBC 的影响(n=3)

Fig. 4 Effect of pH on media IC and protein SBC (n=3)

2.2 色谱介质的表面形貌表征

通过 SEM 对 FastSep-epoxy 和 FastSep-PAA 的形貌进行了表征,如图 5 所示。从 FastSep-epoxy的全貌、表面及内部结构图,可以看出,该微球的表面及内部均存在微米级的大孔,同时孔隙之间有较好的连通性,这些特征均有利于蛋白等生物大分子在介质内部的自由扩散。

将图 5 中低 IC(0.20 mol/L)与高 IC(0.37 mol/L)的 FastSep-PAA 的全貌、表面及内部结构图与 FastSep-epoxy 进行对比,发现其接枝前后,微球球形未发生变化,微球表面及内部孔道结构无明显变化,孔道连通性较好,内外部孔径无明显差异,蛋白传质无影响。

2.3 色谱介质孔径对蛋白 DBC 的影响

色谱介质孔径尺寸对于蛋白传质有显著影响[23,24],本工作考察了 FastSep-PAA 原始孔径尺寸(即 FastSep-epoxy 的孔径尺寸)对蛋白 DBC 的影响规律。首先通过压汞法测定 FastSep-epoxy 的孔径尺寸(厂家标注平均孔径尺寸范围 300~1 000 nm),其结果如图 6 所示,测得的平均孔径与微球厂家说明书所给的平均孔径较为相符,因此下文继续按厂家所提供的平均孔径对其进行区分。

对不同孔径的 FastSep-PAA 色谱介质进行了蛋白 DBC 测定,其结果如表 1 所示。在 300~1 000 nm 孔径范围内,其蛋白 DBC 并未出现随介质孔径尺寸增加而显著下降的现象。其中原始孔径为 400 nm 的介质蛋白动态结合容量最高(70.3 g/L);原始孔径增大至 1 000 nm 孔径时,其蛋白动态结合容量有所下降,但仍能保持在 60.0 g/L 水平,这是因为孔径增大有利于提高蛋白在介质内部的传质速度,这抵消了由孔径增大导致比表面积降低带来的部分不利影响;减小原始孔径至 300 nm 时,FastSep-PAA 介质的 DBC 稍有降低(68.6 g/L),这可能是由于接枝的大分子 PAA 长链占据了部分孔隙内空间,孔内空间位阻增大,导致蛋白的可及孔隙空间减小,DBC 降低[14,19]。

为更进一步分析接枝 PAA 对于介质结构的影响,采用氮气吸附法测定了接枝后不同孔径的色谱介质的孔径分布。本工作所用 PAA 分子的分子质量范围为 10~20 kDa,根据文献[25],按式(4)计算 PAA 的分子半径:

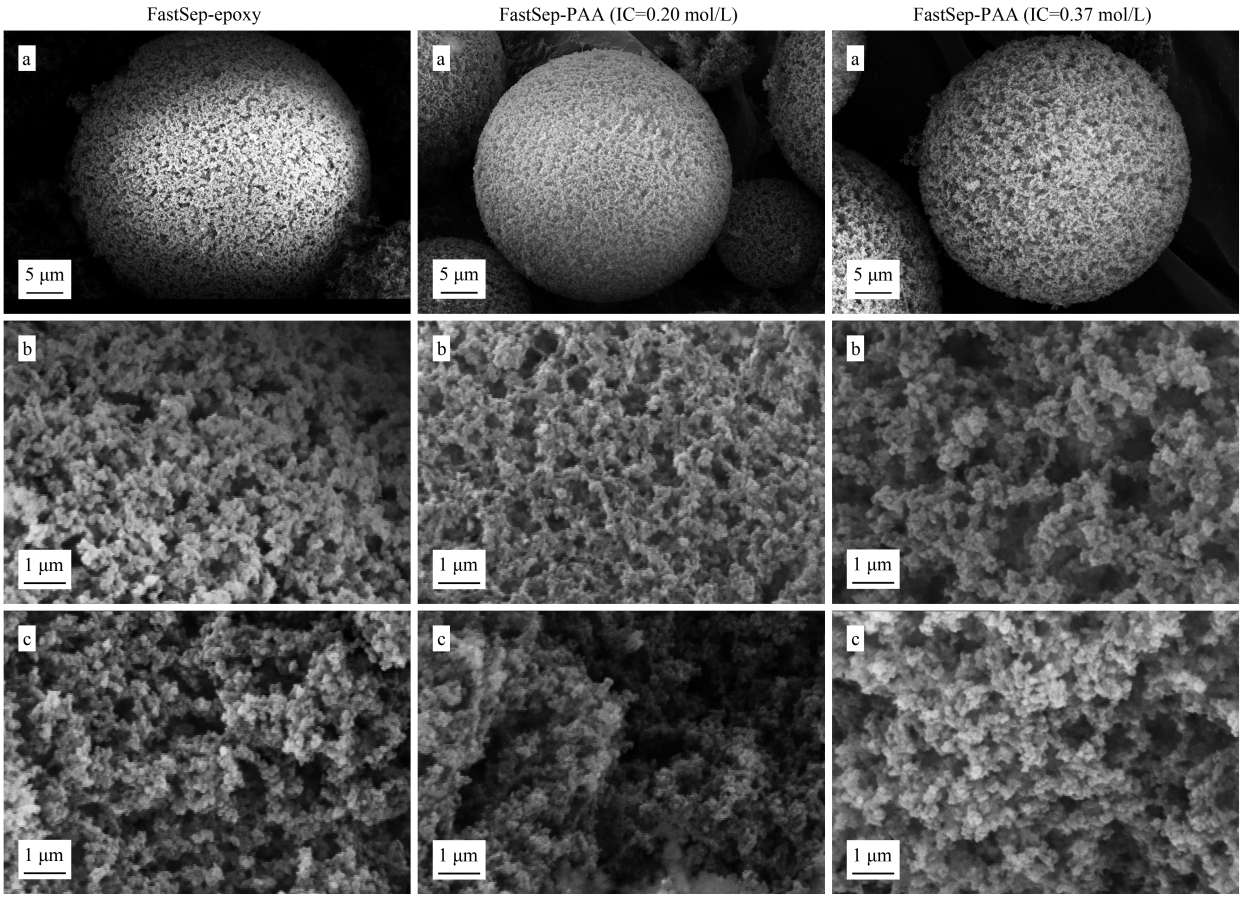


图 5　FastSep-epoxy 与 FastSep-PAA 的 SEM 图

Fig. 5　SEM images of FastSep-epoxy and FastSep-PAA

a. bulk; b. surface; c. internal structure.

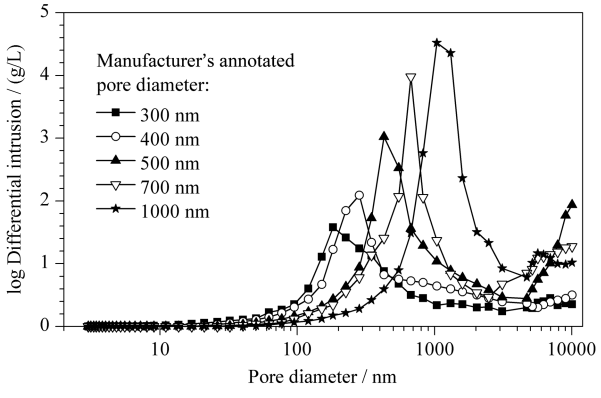


图 6　压汞法测定的 FastSep-epoxy 的孔径分布

Fig. 6　Pore diameter distributions of FastSep-epoxy determined by mercury intrusion method

$$r=\frac{k_{\mathrm{B}}TM^{0.549}}{4\pi\eta K} \tag{4}$$

式中:k_{B} 是玻尔兹曼常数,1.380 649×10^{-23} J/K; T 是温度,K; M 是聚合物的相对分子质量;η 是黏度,Pa·S; K=3×10^{-8} m^2/s,由聚合物-溶剂系统所决定。

表 1　不同原始孔径的 FastSep-PAA 的 DBC

Table 1　Dynamic binding capacities (DBC) on FastSep-PAA with different original pore diameters

FastSep-epoxy pore size[a]/nm	FastSep-epoxy pore size[b]/nm	DBC/(g/L)
300	324	68.6
400	419	70.3
500	541	61.3
700	717	58.6
1000	1038	60.0

a: FastSep-epoxy average pore size provided by manufacturer's instructions; b: FastSep-epoxy average pore size by mercury intrusion method.

将所用的 PAA 分子的相对分子质量和具体实验环境温度代入公式(4)计算得到的 PAA 分子尺寸为 1.7~2.5 nm,该类分子化学键合至孔道表面后,对介质的介孔(2~50 nm)影响较大,因此,文中采用氮气吸附法主要对介质中小于 100 nm 的孔径进行分析对比,所测定结果如图 7 所示。从 BET 图中可以看出:接枝后的介质 FastSep-PAA 孔径分布均主要由介孔组成,大孔(>50 nm)含量随孔径增加

而增加,而微孔(<2 nm)则几乎没有,这是因为接枝 PAA 堵塞了微孔[19,21]。

图 7 显示 FastSep-PAA-300、400、500、700 和 1000 孔径分布主要集中于 2~10、5~20、10~40、10~50 和 10~60 nm。对比 PAA 分子尺寸发现,FastSep-PAA-300 结构受 PAA 接枝影响最大,PAA 的接枝会导致介质孔隙内空间减小,孔内空间位阻增加,导致蛋白的可及孔隙空间减小,从而造成了蛋白结合容量的降低[19,21];而其他孔径介质结构虽然也受 PAA 接枝影响,但孔径增加有利于提高蛋白分子在介质内部的传质速率,这一效应有利于提高蛋白结合容量,这抵消了接枝 PAA 带来的不利影响,因此出现了 DBC 随孔径增加而不变的情况。

2.4 流速对色谱介质的蛋白 DBC 的影响

介质孔径增加通常有利于蛋白分子在其内部传质[2,7,26]。为了进一步验证 2.3 节中的孔径尺寸影响蛋白传质的结果,分别测定不同孔径的介质在 63、126、251、377、502、628 cm/h 流速下的蛋白 DBC,不同孔径的色谱介质的蛋白 DBC 随流速变化如表 2 所示。在相同流速下,比较不同孔径介质的蛋白 DBC, FastSep-PAA-400 均表现出较高的蛋白 DBC,这是因为相比较其他较大孔径的介质,该孔径比表面积较大,蛋白可吸附位点较多;而 FastSep-PAA-300 接枝 PAA 后孔隙内空间减小,孔内空间位阻增加,蛋白可及孔隙空间减小,DBC 下降,这抵消了比表面积增大带来的部分优势[19,20]。

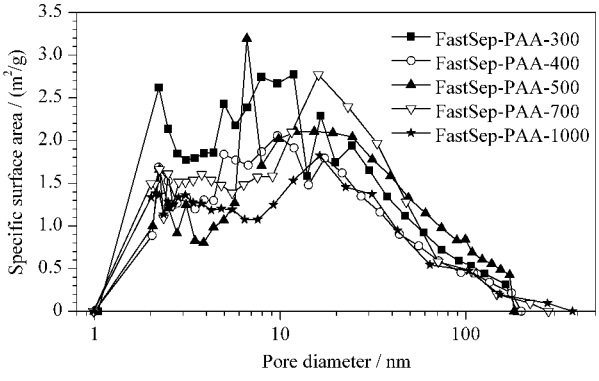


图 7 BET 测定不同孔径 FastSep-PAA 的比表面积

Fig. 7 Specific surface area of FastSep-PAA with different pores by BET

在较小原始孔径(300、400、500、700 nm)的 FastSep-PAA 介质的蛋白 DBC 测试中,随着流速的增加,蛋白的穿透体积减小,蛋白 DBC 下降,比较 126 cm/h 和 628 cm/h 流速下的蛋白 DBC,流速增加 5 倍,蛋白 DBC 下降幅度均在 13%~21%,这是因为介质本身孔径就相对较小,而且吸附的蛋白也会占据部分孔隙内空间,造成孔内空间位阻增加,甚至堵塞孔道,因此随着流速的增加,越来越多的蛋白分子来不及扩散进入介质内部,造成了 DBC 的下降[2,9];而在较大原始孔径(1 000 nm)的 FastSep-PAA 介质测试中,随着流速的增加,蛋白 DBC 降低幅度较小(57~63 g/L),流速增加 5 倍,蛋白 DBC 仅下降 3.5%,这说明蛋白分子在该孔径下的扩散速率受限较小[2,9],该孔径介质的传质性能优异,适合于高通量分离纯化,而且在 628 cm/h 的流速下蛋白 DBC 能够保持在 57.7 g/L。

表 2 不同原始孔径的 FastSep-PAA 在不同流速下的 DBC

Table 2 DBC of FastSep-PAA with different original pore diameters at different flow rates

Original pore size[a]/nm	DBC under different flow rates/(g/L)						Decrease in DBC[b]/%
	63 cm/h	126 cm/h	251 cm/h	377 cm/h	502 cm/h	628 cm/h	
300	68.7	68.6	60.1	59.4	65.5	58.7	14.4
400	76.4	70.3	62.9	63.3	59.7	56.3	19.9
500	68.0	61.3	62.1	58.1	56.3	52.9	13.7
700	68.2	58.6	60.3	55.9	51.0	46.5	20.6
1000	56.9	60.0	62.9	62.3	59.7	57.7	3.5

a: FastSep-epoxy average pore size was provided by manufacturer's instructions. b: The difference in protein DBC on chromatographic media with different pore sizes were calculated at flow rates of 126 cm/h and 628 cm/h, respectively.

3 结论

本工作以大孔聚丙烯酸酯微球为基质,通过接枝聚(烯丙基胺)制备了大孔阴离子交换层析介质。通过精确控制接枝过程中的反应条件,进一步优化接枝效率,获得了具有高性能的介质;进一步探究了孔径、流速对蛋白动态结合容量的影响,结果表明 FastSep-PAA-1000 介质的蛋白传质性能优异,在高通量分离纯化中具有较好的应用前景。

参考文献:

[1] Liu S L, Li Z H, Yu B, et al. Adv Colloid Interface Sci, 2020, 284: 102254

[2] Dai N, Wang S Y, Li H, et al. J Chromatogr B, 2019, 1128: 121794

[3] Wang S H, Li X X, Sun Y. J Chromatogr A, 2019, 1597: 187
[4] Liu X Y, Wang Y, Cong H L, et al. J Chromatogr A, 2021, 1653: 462313
[5] Xiao J Y, Lu Q B, Cong H L. Polym Chem, 2021, 12(42): 6050
[6] Dai N, Wang S Y, Li H. J Chromatogr B, 2019, 1128: 121794
[7] Zhao L, Huang Y D, Zhu K, et al. Eng Life Sci, 2020, 20(11): 504
[8] Yu Y, Wu X L, Li Y, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2016, 44(12): 1874
于嫄, 吴兴兰, 李尹, 等. 分析化学, 2016, 44(12): 1874
[9] Li H, Wang S Y, Fang J X, et al. Chemical Journal of Chinese Universities, 2018, 39(12): 2673
李恒, 王少云, 方嘉璇, 等. 高等学校化学学报, 2018, 39(12): 2673
[10] Yu L L, Sun Y. J Chromatogr A, 2021, 1638: 461865
[11] Yu L L, Tao S P, Dong X Y, et al. J Chromatogr A, 2013, 1305: 76
[12] Yu L L, Tao S P, Dong X Y, et al. J Chromatogr A, 2013, 1305: 85
[13] Zhao L, Li S, Wang W, et al. J Chromatogr A, 2021, 1637: 461831
[14] Chai M, Zhang X, Zhao W L, et al. Microchem J, 2022, 177: 107310
[15] Zhao Y Y, Yu L L, Dong X Y, et al. J Chromatogr A, 2018, 1580: 72
[16] Qiao L Z, Du Y C, Du K F. Sep Purif Technol, 2022, 297: 121434
[17] Zheng H W, Wang C Y, Pavase T R, et al. Colloids Surf B, 2022, 217: 112705
[18] Yu L L, Zhai Q H, Sun Y. J Chromatogr A, 2020, 1610: 460538
[19] Li M, Li Y Y, Yu L L. et al. J Chromatogr A, 2017, 1486: 103
[20] Li M, Yu L L, Liu Y, et al. Biochem Eng J, 2018, 134: 94
[21] Li M, Wu Y, Liu Y, et al. Biochem Eng J, 2019, 142: 153
[22] Zhao Y Y, Yu L L, Dong X Y. J Chromatogr A, 2018, 1550: 28
[23] Rakotondravao H M, Takahashi R, Takai T, et al. J Chem Eng Japan, 2022, 55(8): 267
[24] Rakotondravao H M, Ishizuka N, Ishizuka K, et al. J Chromatogr A, 2021, 1656: 462503
[25] Chi W Y, Hou H L, Kang H Y, et al. Fine Chemicals, 2020, 37(7): 1320
池伟亚, 侯恒磊, 康红艳, 等. 精细化工, 2020, 37(7): 1320
[26] Xiao Q, Ma M Z, Chen J, et al. Int J Biol Macromol, 2022, 222: 41