

摘要

为解决膜吸附剂的污染问题,本文提出了纤维色谱与纤维吸附剂的概念,期望能够克服膜色谱和颗粒填充色谱的缺点。本研究采用可控相转化法,制备了多种类型离子交换树脂填充纤维吸附剂,并对其性能进行了表征。

(1) 以聚醚砜(PES)为纤维吸附剂的基质材料,粉状 Lewatit 阳离子交换树脂(CNP80ws 和 SP112ws)用做分离蛋白质的功能性微粒,采用外部液体调控相分离过程,制备了不同形态结构的阳离子交换树脂填充 PES 纤维吸附剂。研究了外部液体、树脂种类与填充量对纤维吸附剂形态结构的影响。研究发现多种外部液体,如二乙二醇单乙醚、三缩四乙二醇、丙酮、N-甲基吡咯烷酮/水混合液等,与纺丝细流接触后改变了聚合物溶液的相分离路径,形成了表皮具有开孔结构的树脂填充 PES 纤维吸附剂。

(2) 研究了树脂填充 PES 纤维吸附剂对模型蛋白质牛血清蛋白(BSA)的吸附与脱附性能,探讨了吸附剂表面形态结构、填充树脂种类、树脂填充量、纤维直径、吸附剂状态等因素对吸附与脱附性能的影响,分析了蛋白质吸附热力学与动力学过程,并对蛋白质传质机理进行了初步探讨。研究结果表明,表皮具有开孔结构的树脂填充纤维吸附剂具有较好的吸附与脱附性能,其蛋白质吸附容量为 68.2~93.2mg BSA/g 吸附剂(树脂填充量 50%);蛋白质在树脂填充纤维吸附剂中的吸附过程符合朗格缪尔吸附模型;溶质在表皮具有开孔结构纤维吸附剂中传质阻力较低。对于蛋白质在树脂填充纤维吸附剂中的传质过程,本文提出纤维吸附剂基体内的孔扩散与树脂内的孔扩散是速率控制步骤。

(3) 考察了 BSA 溶液 pH、BSA 浓度、洗脱剂 pH 和离子强度、吸附剂预处理与后处理、吸附剂再生以及料液流动状态等因素对吸附剂吸附与脱附性能的影响。研究结果对蛋白质的分离具有重要的参考价值。

(4) 为了降低聚合物基质材料对蛋白质的吸附,以乙烯-乙烯醇共聚物(EVAL)为纤维基质材料,制备了表皮具有一定开孔度的树脂 CNP80ws 填充 EVAL 纤维吸附剂。研究了该纤维吸附剂的形态结构及其影响因素。以牛血清蛋白为模型物,对其吸附与脱附性能进行了表征。研究结果表明,树脂填充 EVAL 纤维吸附剂的吸附容量约为 54mg BSA/g 吸附剂(树脂填充量 50%);与树脂填充

PES 纤维吸附剂相比, 虽然树脂填充 EVAL 纤维吸附剂具有较低的吸附容量但其脱附率较高。

(5) 采用羟基保护的方法, 对聚乙烯醇进行部分缩乙醛化改性, 再以所得聚乙烯醇缩乙醛为制膜材料, 相转化成膜后, 在酸性条件下, 一步完成对膜的脱乙醛和戊二醛交联处理过程, 制备了改性聚乙烯醇超滤膜。探讨了聚乙烯醇缩乙醛浓度、铸膜液温度、凝固浴温度与盐含量以及添加剂含量等因素对膜性能的影响, 研究了膜的形态结构、膜的亲水性以及膜耐污染性能。研究表明, 此膜具有较小的接触角、良好的亲水性以及较好的耐污染性能。改性聚乙烯醇亲水性多孔膜不仅有可能用作纤维色谱的基质材料, 而且对抗污染超滤膜的研究具有重要价值。

关键词: 纤维吸附剂、纤维色谱、膜吸附剂、膜色谱、膜、聚醚砜、乙烯-乙醇共聚物、牛血清蛋白

Abstract

Membrane chromatography as a competent method has widely used on bioseparation. In order to solve the problem of fouling by impurities, we proposed the new concept of fiber adsorber, which could be used as the medium of chromatography. Another new concept is the fiber chromatography which is loaded with fiber adsorber in some conformations.

The mixed functional fiber was chose as research platform. The method of controlled phase transfer was used to prepare the mixed functional fiber adsorber in this work. Resin mixed fibrous adsorbers are a new type of ion exchange adsorbers.

To improve the performance of mass transport of these adsorbers a study was carried out to increase the surface porosity and the pore interconnectivity of the adsorber. For this different external liquids were applied in the phase inversion process, such as diethylene glycol monoethyl ether, acetone, tetra-ethylene glycol, and NMP/water mixtures. Using the same external liquid the surface of polyethersulphone matrix was rougher by use of weak cationic resins(CNP80ws) than by use of strong cationic resins(SP112ws). Applying of a high resin loading resulted in a high surface porosity.

The resin mixed PES-based fibrous adsorber was developed to study its adsorption and desorption behavior with BSA in this work. The fibrous adsorber with open pore surface had much better adsorption and desorption behavior with higher diffusion coefficient. The adsorption capacity of fibrous adsorber with open pore surface was comparable with the resin's static adsorption capacity. The high loading of resin in fibrous adsorber had high adsorption capacity and high desorption. The adsorption capacity of the adsorber with thin diameter was higher than thick fibrous adsorber. The adsorption isotherm demonstrated that the adsorption was well fitting the langmuir model. As for the mass transport process it could be imaged that the pore diffusion in the pore of fiber matrix and the pore of resin particle should possibly be the rate-determined process.

The influence of operation parameters on the behavior of adsorption and desorption of BSA with the weak acidic type cation exchange resin mixed PES-based fibrous adsorber in different structures was also investigated in this work. These factors are pH and flow state of BSA buffer solution, the choice of eluents, pre-treatment and post-treatment of fibrous adsorber, and regeneration of adsorbers etc.

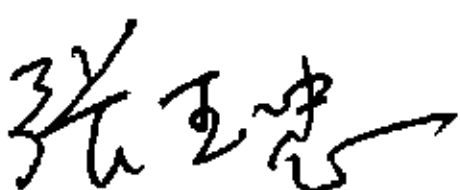
In order to reduce non-specific adsorption caused by hydrophobic attraction, Another hydrophilic polymer EVAL was chose as the fiber substrate to form matrix of fiber. Incorporated with resin powder in fiber matrix, the resin CNP80ws mixed EVAL fiber adsorber with some extent of open pore on its surface was prepared by the method of controlled phase transfer. The morphological structures of fiber adsorbers and some factors influenced were investigated. The behavior of adsorption and desorption with model protein BSA was also studied. The results shown that the desorption of resin CNP80ws mixed EVAL fiber adsorber was much better.

In this work the hydrophilic polymer used as the fiber adsorber substrate was developed in order to weak the binding of substrate with protein. Poly(vinyl alcohol) was partly modified by acetaldehyde in order to protect the -OH group on the chain of PVA. The modified PVA with aldehyde was easy to get porous UF membrane through phase transfer method. The modified PVA membrane was treated with glutaraldehyde in acidic condition. The aim of this step was to remove aldehyde and crosslink PVA membrane, which was carried out at same time in single step. The result was to get the hydrophilic membrane with good mechanical strength. It could be predicted that this modified PVA hydrophilic porous membrane would be hopefully used as substrate in fiber and/or membrane chromatography.

Key words: membrane, chromatography, membrane chromatography, membrane adsorber, fiber adsorber, fiber chromatography, resin mixed membrane, resin mixed fiber, PES, EVAL, BSA

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作和取得的研究成果,除了文中特别加以标注和致谢之处外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果,也不包含为获得 天津工业大学 或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

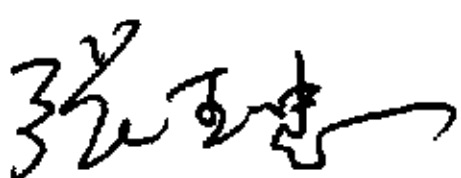
学位论文作者签名: 

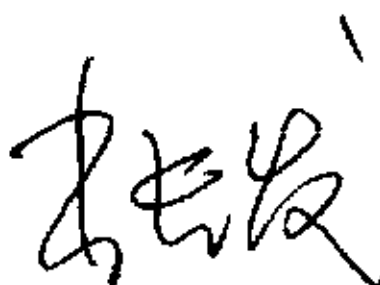
签字日期: 2004 年 2 月 8 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解 天津工业大学 有关保留、使用学位论文的规定。特授权 天津工业大学 可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索,并采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编以供查阅和借阅。同意学校向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘。

(保密的学位论文在解密后适用本授权说明)

学位论文作者签名: 

导师签名: 

签字日期: 2004 年 2 月 8 日

签字日期: 2004 年 2 月 8 日

第一章 序言

1.1 论文的选题依据

膜色谱 (membrane chromatography) 是近期发展起来的新型生物分离技术。它是膜分离技术和色谱技术二者之间有机结合的产物。膜色谱介质是通过选择制备合适的膜, 将对生物大分子有特异性和选择性的基团连接到膜的表面及孔壁中去制备而成^[1]。

膜色谱组件是由一张或多张功能性膜片构成的, 其功能相当于短而粗的色谱柱。按照功能分类, 膜色谱可分为亲和膜色谱、离子交换膜色谱、固定化金属螯合膜色谱、疏水膜色谱、多级膜色谱等^[2], 其中离子交换膜色谱是膜色谱中的一个大类, 按照荷电基团的不同可分为磺酸类 (S)、季铵盐类 (Q)、二乙基胺乙基 (DEAE)、及磺丙基 (SP) 等。至今已报道多种类型膜色谱组件^[3, 4], 例如: 平板式、中空纤维、螺旋卷式及折叠式等, 其中一些已得到应用。

由于以多孔膜作为基质材料, 使膜色谱具有很多的潜在优势^[5]。例如, 料液流速加快、停留时间缩短, 压力降适宜, 蛋白质的吸附分离所需的时间只是普通填充柱十分之一, 膜吸附剂具有较高的蛋白质吸附容量, 蛋白质可快速地被浓缩至 10 倍甚至更多, 其回收率可达到 85%~100%。

膜色谱作为一种有竞争力的分离方法在生物制品的分离纯化中应用明显增加。它主要用于蛋白质及单克隆抗体等生物大分子的分离纯化以及热原等污染物的去除。有人称该方法是蛋白质下游处理的完整性技术^[6]。然而, 应用膜色谱技术需要对料液进行预处理, 须除去料液中的不溶性颗粒与类脂等物质, 否则这些物质将堵塞膜, 造成膜吸附剂的性能下降。

鉴于上述原因, 本文提出了纤维吸附剂与纤维色谱的概念, 期望纤维色谱能够克服膜色谱与颗粒填充色谱的缺点。

对于纤维吸附剂的研究, 本文研究思路为: 以杂化纤维为研究平台, 选用对蛋白质吸附较弱的高分子作为基质材料, 粉末型大孔离子交换吸附树脂作为功能微粒, 采用可控相分离的方法, 研究制备具有离子交换功能的树脂填充纤维吸附剂, 以牛血清蛋白为模型物, 对其进行吸附与脱附性能的研究, 以确认纤维吸附

剂作为色谱介质的可行性与有效性,以期用于生物制品的分离纯化。

1.2 论文结构与内容

论文的第二章对膜色谱的研究现状进行了综述。简述了膜吸附剂的分类、特点、制备方法及其应用。

第三章提出了纤维色谱与纤维吸附剂的概念,采用可控相分离方法,量身定制各种形态结构的树脂填充纤维吸附剂。该章工作采用不同种类的阳离子交换树脂为功能颗粒,聚醚砜(PES)为纤维基质材料,制备了表皮具有开孔结构的树脂填充 PES 纤维吸附剂。研究了该类吸附剂的形态结构以及影响纤维吸附剂形态结构的因素,并且以牛血清蛋白为模型物,对其进行吸附与脱附性能的初步研究,以便确认纤维吸附剂作为色谱介质是可行与有效的。

第四章重点研究了不同形态结构的树脂填充 PES 纤维吸附剂与模型蛋白质的吸附与脱附行为。探讨了纤维吸附剂形态结构、树脂种类与填充量、纤维尺寸等因素对吸附剂的吸附与脱附性能的影响。得到了纤维吸附剂的等温吸附曲线,并与朗格缪尔吸附模型进行了比较。另外,研究并估算了蛋白质在纤维吸附剂中的有效扩散系数,提出了蛋白质在树脂填充纤维吸附剂中的传质机理。

第五章对影响吸附剂吸附与脱附性能的操作因素进行了探讨。研究了 BSA 溶液 pH、洗脱剂 pH 与离子强度、吸附剂的预处理与后处理、BSA 溶液流动状态以及吸附剂的再生等因素对蛋白质的吸附与脱附性能的影响。

为了提高纤维吸附剂的脱附率,降低聚合物基质材料对蛋白质的吸附,第六章选择乙烯-乙烯醇共聚物(EVAL)为纤维基质材料,制备了表皮具有一定开孔度的树脂 CNP80ws 填充 EVAL 纤维吸附剂。研究了该类吸附剂的形态结构、影响其形态结构的因素以及对牛血清蛋白的吸附与脱附性能。在该章还对制备的多种类型吸附剂进行了比较,并提出了进一步研究改进的方向。

第七章对基质材料的选择进行了研究。采用羟基保护的方法,对聚乙烯醇部分缩乙醛化改性,再以所得聚乙烯醇缩乙醛为制膜材料,相转化成膜后,在酸性条件下,一步完成对膜的脱乙醛和戊二醛交联处理过程,制备了改性聚乙烯醇超滤膜。探讨了聚乙烯醇缩乙醛浓度、铸膜液温度、凝固浴温度和盐含量以及添加

剂含量等因素对膜性能的影响,研究了膜的形态结构、膜的亲水性以及膜耐污染性能。

1.3 论文的创新点

(1) 为了克服膜色谱及颗粒填充色谱的缺点,提出了纤维吸附剂和纤维色谱的概念。

(2) 制备了离子交换树脂与聚合物基质材料杂化而成的多种纤维吸附剂,如树脂 CNP80ws 填充 PES 纤维吸附剂、树脂 SP112ws 填充 PES 纤维吸附剂、树脂 CNP80ws 填充 EVAL 纤维吸附剂等。这些纤维吸附剂均具有较高的蛋白质吸附容量,为纤维吸附剂的研究开发提供了一条可行之路。

(3) 利用外部液体调控相分离过程,能够量身定制纤维的表面形态结构,从而制备了表面具有开孔结构的纤维吸附剂。具有这种结构的纤维吸附剂可以降低溶质的传质阻力,使吸附剂的吸附速率得到提高。

(4) 选择羟基保护的方法降低聚乙烯醇的亲水性,使之容易制备成超滤膜,然后采用一步水解交联法边水解边对膜进行交联,使膜的亲水性恢复,制备了亲水性超滤膜,为制备非特异性吸附低的纤维吸附剂提供了一条新途径。

(5) 分析了蛋白质在树脂填充纤维吸附剂中传质机理,提出了传质阻力方程,并指出吸附剂基体内的孔扩散与树脂内的孔扩散是吸附过程中传质速率的控制步骤。这对纤维吸附剂的结构设计具有重要的指导意义。

1.4 参考文献

- [1] 商振华、周良模 膜亲合色谱的现状、发展和应用, 化学进展, 1995, 7 (1): 47-58
- [2] Raja Ghosh, Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges J. Chromatography A, 952 (2002) 13-27
- [3] D. Keith Roper, Edwin N. Lightfoot, Separation of biomolecules using adsorptive membranes, J. Chromatography A, 702(1995) 3-26
- [4] Catherine Charcosset, Purification of Proteins by Membrane Chromatography, J. Chem. Technol. Biotechnol. 71(1998) 95-110
- [5] Elias Klein, Affinity membranes: a 10-year review J. Membrane Science 179

(2000) (1-27)

- [6] J. Thommes and M. R. Kula, Membrane Chromatography-An Integrative Concept in the Downstream Processing of Proteins *Biotechnol. Prog.* 11 (1995) 357-367

第二章 膜色谱技术进展

近年来,生命科学和生物工程得到了迅速发展,分离过程占蛋白、酶、多肽及疫苗等生物制品成本的 30%-60%。分离过程的成效已成为生物技术发展的一个重要方面。一般来讲,生物制品下游产品的纯化需经过碎片分离、初步纯化与精制等过程。精制方法包括填充床液相色谱技术、电泳技术、超临界萃取及膜分离技术等。以颗粒为介质形式的填充床液相色谱技术是解决生物工程下游产品回收和纯化的高效方法之一。但色谱有其固有缺陷,如流速低、色谱填充料压实结块、溶质扩散传质慢、柱效率低以及难以放大等。

由于膜分离技术具备低温操作、保活性好、设备较为简单、处理量大、操作方便、易于实现自动化等特点,作为生物大分子纯化分离的有力工具已得到迅速发展,尤其适用于工业规模对目标产品的纯化分离。然而,膜分离技术是利用膜的孔径大小对目标物进行分离,分离产物的纯度相对较低。例如,采用超滤技术分离生物大分子时,一般相对分子质量要相差十倍以上才能有效分离,而对于那些相对分子质量仅相差几倍的体系则分离效果较差。

自 20 世纪 80 年代中期就有人试图将膜分离和色谱这两种技术有机的结合起来,发挥各自的长处,即选择制备合适的膜,将对生物大分子有特异性和选择性的基团连接到膜的表面及孔壁中去,从而制备一种新型的色谱介质即膜色谱介质,也有人称之为吸附膜(adsorptive membrane)^[1-5]。这种分离技术称为膜色谱(membrane chromatography)或称为膜吸附剂(membrane adsorber)^[1-5]。

2.1 膜色谱的工作原理和特点^[1-5]

膜色谱采用具有一定孔径的膜作为介质,连接配基,利用膜配基与蛋白质等目标分子之间的相互作用进行分离纯化,当料液以一定流速流过膜时,目标分子与膜介质表面或膜孔内基团特异性结合,而杂质则透过膜孔流出,待处理结束后再通过洗脱液将目标分子洗脱下来,其纯化倍数可达数百乃至上千倍,可见其分离选择性很高。膜色谱中的每一片膜都相当于一个短而粗的吸附床层,膜厚相当于床层高度,当床层体积一定时,这种结构有利于在相同压降下获得更高的流速,

从而提高了分离速度和处理量。

与液相色谱技术相比, 由于在膜多孔基质上配基与液流之间扩散路径极短, 传质极快, 膜色谱的分离时间显著缩短, 分离效率提高; 由于膜的空隙率大, 孔表面积很大, 所以膜的厚度很薄就能满足分离要求, 并且压力降较低。由于膜的元件都是标准的, 膜色谱易于放大, 便于实现大规模连续分离和自动操作。

与普通的膜技术相比, 用膜色谱分离时, 由于它不单是利用膜孔的大小, 更主要的是利用吸附膜的特异性和选择性, 所以不受溶质分子量大小的限制。原则上讲, 只要选择合适的膜, 采用有效的活化手段, 键合上能与溶质产生亲和相互作用的配位基, 它就可以从复杂体系, 尤其是细胞培养液和发酵液中分离和制取出任何一种目标物。可见, 膜色谱分离是生物大分子分离纯化的有力工具。然而在使用时也会发生一些问题, 如, 料液中的不溶性颗粒与类脂等物质对膜的堵塞与污染, 从而造成膜吸附剂的功能下降。因此, 应用膜色谱技术须对料液进行适当的预处理。

2.2 膜色谱介质材料及其组件

吸附膜介质的选择是影响膜色谱分离效果的重要因素之一。理想的膜介质具有以下性质: 有大量适当大小的孔及较窄的孔径分布, 以便偶联尽可能多的配基, 并为配基与目标蛋白的相互作用提供场所; 对杂蛋白的吸附应尽可能小, 以提高产品纯度; 膜介质上应具有羟基、环氧基等可活化的基团, 以便与配基进行偶合; 具有一定的物理与化学稳定性, 能承受液流穿过膜孔时产生的剪切力, 可进行反复的吸附、洗脱、再生、灭菌过程; 所选膜材料还应易于成膜, 且来源广泛、成本较低。目前, 常用作膜色谱介质的材料可分为天然高分子材料与合成高分子材料等。

天然高分子材料如纤维素、壳聚糖等, 与配基的结合较为方便, 且具有较好的化学稳定性。改性纤维素膜作为亲和膜色谱的基质, 其孔隙率较高、孔径较大 ($1\sim 2\mu\text{m}$), 但结构均一性较差。为加强机械和化学稳定性, 可在偶联配基前先用环氧氯丙烷交联^[6]。甲壳素/壳聚糖及其衍生物形成的多孔膜, 可采用有机硅、过渡金属、酶对其进行改性, 改性后可制成特殊功能膜介质。

合成高分子材料如聚砜、聚酰胺等,具有优良的成膜性能及良好的机械和热稳定性,活化处理后其性质变化不大,非常适合作为膜介质。聚砜膜活化后可偶联三嗪染料或金属离子等配基。聚酰胺微孔膜孔径分布较窄且机械稳定性较好,但存在非特异性吸附,而且配基偶联密度较低。对聚酰胺膜进行酸水解后,可增加膜上反应性基团数目,并使其具有一定的亲水性,经活化后膜表面含多羟基物质,可减少非特异性吸附^[7]。聚乙烯膜接枝甲基丙烯酸缩水甘油酯也是一种良好的膜介质^[4]。

聚醚砜-聚乙烯氧化物-羟乙基纤维素(PES-PEO-HEC)复合膜是以 PES 和 PEO 的共混膜为基膜,在膜的表面共价连接 HEC,以增加亲水性基团并便于配基的偶联,PES-PEO-HEC 膜对蛋白质非特异性吸附很小^[8]。Tennikova 等^[9]在甲基丙烯酸缩水甘油酯-乙烯基二甲基丙烯酸酯(GMA-EDMA)共聚膜上进行低聚物 GMA 的接枝改性,可提高原来膜的机械强度且减少了膜的非特异性吸附。

膜色谱组件是膜色谱的心脏部分。原则上讲,在超滤和微孔过滤中所使用的各种形式的膜分离组件都可用作膜色谱组件,但由于亲和膜的制备涉及到膜的活化、化学改性、间隔臂和配位基的共价结合、样品与配基的偶联及目标物的洗脱解离等过程。因此,要求它们既要耐酸、碱、各种盐及有机溶剂,又要耐高温消毒和低温操作。目前,在膜色谱中已使用的有平板式、折叠式、卷式、中空纤维式等膜组件^[3],如图 1 所示。对于膜色谱组件的设计加工制作,除要求死体积小、流动性好、能耐压、密封,尽量避免产生涡流及紊流外,还要考虑样品在吸附膜上的分配、传递速度要快、均匀,不产生泄漏,组装、拆卸、清洗方便等因素。因此,除膜色谱组件壳体本身要精心设计制作外,还要对分配器、密封圈等作仔细的制作和选择。

据报道,美国 Millipore 公司研制了一种小型蝶式膜色谱组件,在膜中夹有很细的硅胶微粒(粒径 1.2 微米),它们与膜压在一起形成带有类似三明治夹心的复合膜(Memsep)。该组件的体积有 1.4mL 和 1.8mL 两种规格,可承受约 0.7MPa 压力。在对硅胶进行活化并共价结合上 A 蛋白后可用于免疫球蛋白 IgG 的分离。这种膜色谱组件现已有商品出售^[11]。

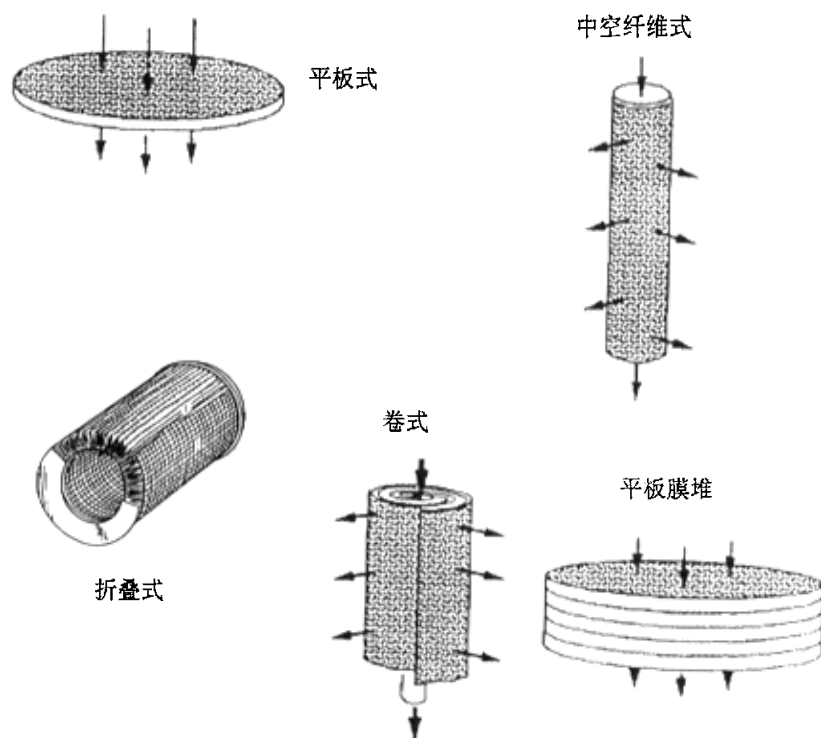


图 1 膜色谱组件类型

2.3 亲和膜的制备

一般在选定膜材料以后，常采用以下两种路线制备膜色谱介质：

- (1) 膜材料→成膜→活化→配基偶联，该路线主要是利用现有商品膜，通过对其进行偶联改性来获得所需膜色谱柱；
- (2) 膜材料→活化→配基偶联→成膜，该路线是从最简单的膜材料入手，先制备功能化的膜材料，再使之成膜。

配基通常是指能够与目标产物进行可逆的和特异性结合的分子或基团，按其来源可分为天然配基（如凝集素、肝素、核苷酸、蛋白 A、蛋白 G 等）和人工合成配基（活性染料、过渡金属离子、人工合成肽段、烷基等）两类。天然配基的性能优于人工合成配基，但其制取和提纯较困难，价格昂贵且使用条件苛刻，

故实际应用中应结合分离目标慎重考虑。按作用对象,配基又可分为特异性配基和通用性配基。特异性配基能够与目标分子高度特异性结合,基本上是一一对应的关系,如单克隆抗体-抗原间的结合,这类配基较为昂贵且不易保存;通用性配基则能对具有特定基团的某一类分子进行特异性吸附,如凝集素-糖蛋白间的结合,这类配基的缺点是纯化倍数不如特异性配基。

配基在与载体偶联后,才能形成具有分离作用的亲和介质。偶联方法有两种:一种是先将普通载体的表面活化,再将配基偶联上去;另一种方法则是先将配基偶联到载体原料上,再利用偶联后的原料制备亲和载体。一般来说,前一种方法(先活化再偶联)配基用量较少、利用率较高,应用较广。关于配基偶联方法的报道很多^[7],较常用的有溴化氰法、环氧乙烷法、三嗪法、羰基二咪唑活化法、高碘酸盐氧化法、硼氢化钠还原法、磺酰氯法、碳二亚胺法、混合酸酐法和氟甲基吡啶盐法等,其中,前四种方法目前应用最为普遍和有效。对于金属离子螯合膜色谱则还需在配体上螯合金属离子^[10]。在分离中金属离子起桥梁作用,一侧与载体膜相连,另一侧与生物分子配位结合。在螯合金属离子时,金属离子的配位点既要保证能与螯合剂形成稳定的化合物,又要保证有剩余的位点留给生物配体。这种方法制得的配体稳定,对蛋白质的吸附量大,吸附-脱附条件温和,成本低,但需注意金属离子的泄漏问题。

配基可以直接固定在载体上,但由于采用这种方法偶联的配基与目标分子的结合存在着一定的空间位阻,所以偶联后配基与目标分子的结合常数一般要降低数倍至数十倍。这种变化对结合力较弱的亲和体系有非常大的影响。为消除这种现象,可在配基与载体之间引入间隔臂,以增加配基与载体之间的距离,减少空间位阻的影响。通常,配基与载体之间应插入4~6个亚甲基桥。如果配基本身是直链大分子,或亲和分离的目标物质为生物小分子,则可以不使用间隔臂。

2.4 溶质的传质过程

目前,关于膜色谱的传质机理与数学模型的研究报道逐渐增多^[5],模型中考虑的因素主要有对流、扩散、吸附、脱附等。另外,孔隙率、膜厚、轴向扩散、配基密度等因素也需考虑。

2.4.1 颗粒填充色谱

如图 2 (a) 所示, 颗粒填充色谱的传质过程是由三个步骤决定的, 即颗粒表面的膜扩散 (film diffusion)、颗粒孔隙内的孔扩散 (pore diffusion) 以及溶质与孔内表面配基或其他作用点的结合动力学 (the binding kinetics)。一般来讲, 颗粒内的孔扩散是速率控制步骤。这主要是大分子传递较慢及空间位阻作用的结果。

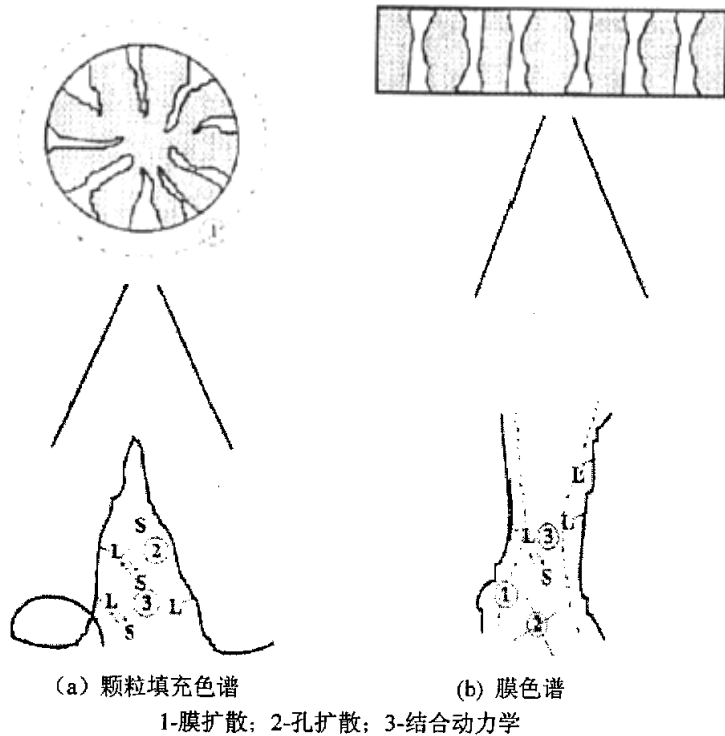


图 2 传质过程示意图^[1]

2.4.2 膜色谱

如图 2 (b) 所示, 以膜为基础的传质过程可分成三个步骤: 透过膜孔的对流过程 (convection)、膜孔内的膜扩散 (film diffusion) 以及溶质与孔内表面配基或其他作用点的结合动力学 (the binding kinetics)。但在对流过程中存在局部对流弥散的现象, 其中缘于膜结构的因素有孔的不规则性、弯曲性以及孔径的分布等。对流弥散是造成膜色谱分离效率较低的主要原因。

与颗粒填充色谱相比, 主要差别在于溶质与基体的作用不是发生在颗粒的死端孔内, 而是在膜的通孔内。发生在死端孔内的传质是通过扩散来实现的, 而在

通孔内的传质是通过对流来实现的。由于消除了孔内扩散,使用膜吸附剂减少了溶质进入基体内的传质阻力,只剩下膜孔内膜扩散作为唯一的传递阻力。通常,由于膜扩散比孔扩散快几个数量级,所以在膜吸附剂中的传质阻力显著地减少。

根据膜吸附剂的传质机理,溶质的传递可分为对流部分与扩散部分,对流部分是在泵压下使液体通过膜介质产生的,而扩散部分则为溶质传递到基体的膜扩散以及在基体内的孔扩散过程。溶质与基质的作用通常由配基与溶质的结合动力学来描述。

将以上的考虑应用于膜吸附剂传质模型研究,须假设膜孔为规则的圆柱体形状,并且在圆柱孔内,溶质浓度均匀地自由分布,不存在本体与吸附面之间的传质阻力。Kula M-R 等^[1]提出了一个连续性方程,用于表达溶质在膜吸附剂的传质过程:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + v \frac{\partial C_i}{\partial z} + \frac{2\partial q}{r\partial t} - D_s \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} = 0$$

式中 $\frac{\partial C_i}{\partial t}$ 代表对流项, $D_s \cdot \frac{\partial^2 C}{\partial z^2}$ 代表扩散传递项, $\frac{2\partial q}{r\partial t}$ 代表配基与溶质之间的吸附相互作用项。

对于膜色谱传质过程,孔扩散可以省略,扩散项可以用轴向弥散项来代替。另外,还需在方程中增加溶质对除配基外的基体吸附项。总之,膜吸附剂传质机理的研究需要在模型研究和实验印证两个方面进一步探索。

2.5 膜色谱分类及其进展

根据配基与目标分子的相互作用方式,膜色谱可分为四类:亲和膜色谱、离子交换膜色谱、疏水作用膜色谱,多级膜色谱。膜色谱可应用于以下几个方面:

- (1) 蛋白质、病毒,基因等生物活性物质的分离纯化,如白细胞介素-2、 α -干扰素、胰蛋白酶、溶菌酶、甲酸脱氢酶、 γ -球蛋白、糖蛋白、血清白蛋白、免疫球蛋白、羧肽酶、核糖核酸、单克隆抗体;
- (2) 中药有效成份的提纯;
- (3) 含生物活性物质的除杂、澄清过滤;

- (4) 血液净化;
- (5) 无病毒、无热原水的制备;
- (6) 超纯水的制备;

2.5.1 亲和膜色谱 (Affinity membrane chromatography, AMC)

亲和膜色谱的分离原理与亲和色谱基本相同,主要是基于待分离物质和键合在膜上的亲和配位基之间的生物特异性相互作用,人们形象地将此相互作用比喻为锁和钥匙之间的对应关系。如图 3 所示,当样品溶液顺着膜表面流过,能与膜的配基产生亲和作用的分子被截留,滞留在膜上,然后再通过洗脱液将目标物从膜上解离出来,从而达到与其他物质分离的目标。这种分离方式的优点是膜具有双重分离功能,不仅目标生物大分子可以和其他分子获得分离,而且同时可去除部分溶剂,达到浓缩目的。

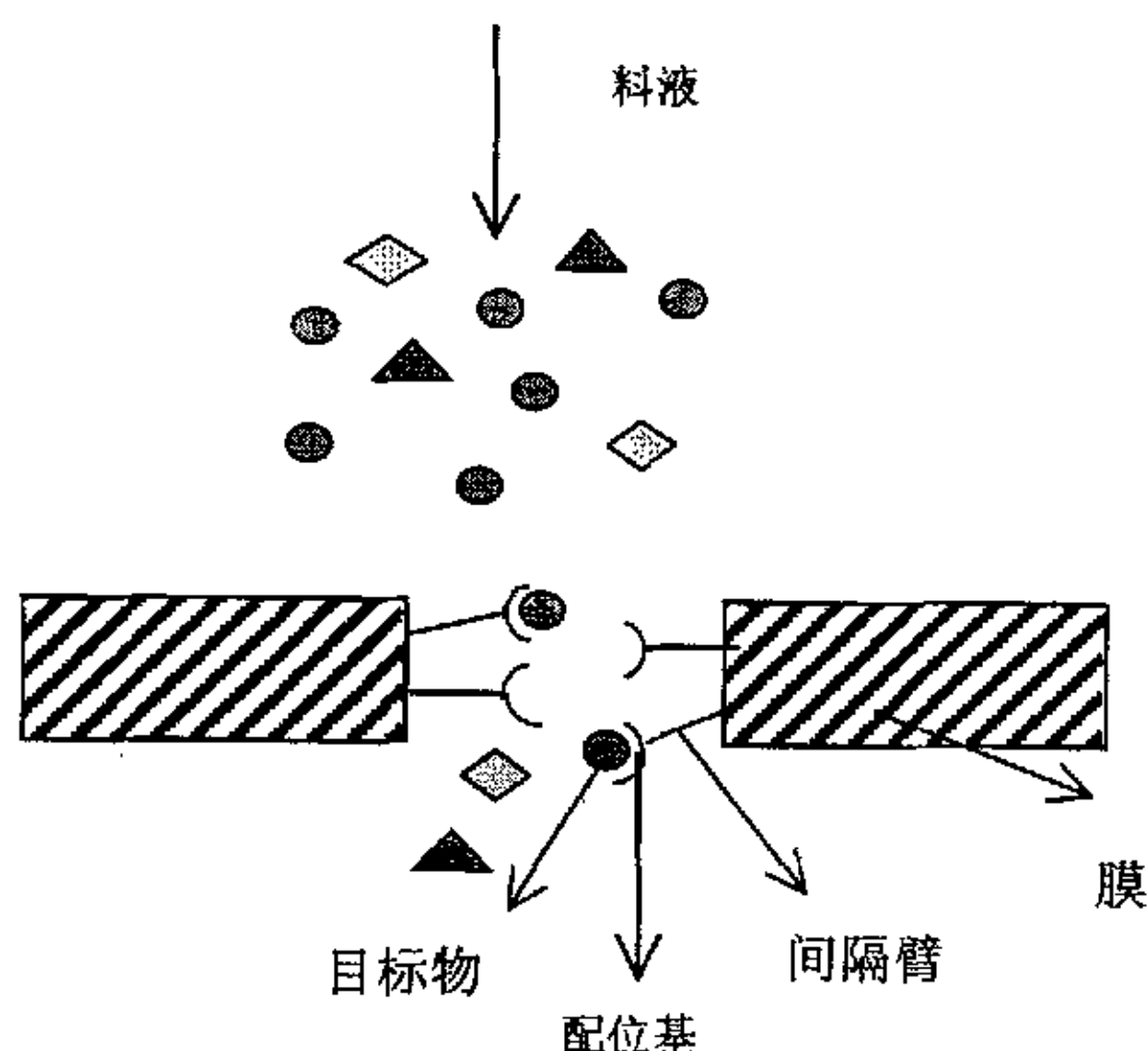


图 3 亲和膜分离原理

蛋白质亲和分离中常用的作用体系有抗原-单克隆抗体, 激素-受体蛋白, 核酸-核酸结合蛋白, 酶-底物 / 产物 / 抑制剂 / 辅酶, 免疫球蛋白-蛋白 A / 蛋白 G, 蛋白质-肝素 / 活性染料 / 过渡金属离子 / 肽段等。

美国 Pall 公司对聚酰胺微孔滤膜 (孔径 0.2 微米) 进行化学改性, 在膜上键合了含氨基的活性染料配基, 并制备了单克隆或多克隆兔抗鼠 IgG 免疫球蛋白^[11]。Millipore 公司已研制成功含蛋白 A 的中空纤维膜分离器, 可用作单克隆抗体的纯化^[11]。Millipore 公司研究表明, 在一个膜体积为 3.5 毫升的分离器上, 将

细胞培养上清液在低流速下负荷, 15 分钟可获得 80 毫克提纯的单克隆抗体, 比同样体积的琼脂亲合色谱柱生产能力要高 100 倍以上。Amerace 公司研制了一种聚乙烯醇和硅胶共混的亲合膜, 在直径为 47 毫米的碟式膜上可结合 20 毫克的牛血清蛋白^[11]。

陈欢林等^[10]采用低温氧或氨等离子体法改性聚丙烯中空纤维微孔膜, 使膜表面产生了-OH、-COOH 和 C=O 等极性基团, 制备了 Fe、Ni、Cu、Zn 等金属离子螯合亲和膜, 用于溶菌酶的分离, 发现螯合膜对溶菌酶有较高的吸附量, 其中制成的 Cu²⁺螯合膜对溶菌酶的平衡吸附量为 8 μ g/cm²。

Platonova 等^[12]以特制的肽段为配基, 经环氧基团活化, 将配基的氨基端偶联在 GMA-EDMA 基质膜上, 获得了免疫亲和膜介质。由于采用与抗原结合位点结构相同的肽段代替了传统的蛋白配基(抗原), 成本大为降低, 可以有效地从血清中鉴定和分离免疫球蛋白抗体。所用十五肽和十六肽配基的饱和吸附量可达 0.42mg/ml 和 1.5mg/ml。

Zeng 等^[13]以大孔甲壳素膜作为膜基质, 分离小麦细菌凝集素, 其机械性能和通透性较好, 而且由于膜表面有大量的 N-乙酰基-D-氨基葡萄糖残基, 无需进一步修饰即可用于蛋白质纯化, 最终产品的纯度(>99%)和产量(50mg/100g)均较高。他们还以对氨基苯(PAB)为配基, 分离胰岛素及类胰岛素酶(尿激酶、血浆酶原活化剂、丝氨酸蛋白酶等)。PAB 是一种胰岛素抑制剂, 其成本大大低于其它抑制剂。利用琥珀酸作为连接臂, 将 PAB 偶联到甲壳素膜上, 可获得较高的配基密度(2.7mmol/g), 对胰岛素的最大吸附容量可达 78.4mg/g。

Zusman^[14]以凝胶玻璃纤维膜为基质, 包埋 p53-IgG 配基, 从结肠癌病人的血清中分离 p53 抗原, 分离出的蛋白质浓度达到 5mg/ml, 是近年来肿瘤相关抗原(TAA)分离的较高水平。

Castilho 等^[15]在聚酰胺微孔膜表面交联葡聚糖和聚乙烯醇, 获得了具有足够活化位点和较低蛋白质非特异性吸附的膜基质, 同时膜的透过性也得到了提高。在膜上偶联蛋白 A 后可用于亲和分离免疫球蛋白 IgG。聚酰胺微孔膜具有良好的机械性能和孔径分布, 但其表面供配基偶联的位点较少, 而且对蛋白质的非特异性吸附较强, 在交联亲水性的葡聚糖和聚乙烯醇后, 膜性能有了较大改进。

2.5.2 疏水膜色谱 (Hydrophobic interaction membrane chromatography, HIMC)

由于疏水配基结构简单,通用性好且成本较低,故疏水色谱已成为蛋白质分离纯化的常用技术之一。但是,目前常用的疏水色谱大多采用琼脂糖凝胶、葡聚糖等“软”基质,分离速度不够理想,且不易放大,疏水膜色谱就是在此基础上发展起来的。

疏水膜色谱上的配基,常用的有甲基、丁基、苯基、辛基、己二胺、聚乙二醇等,通过目标物质与这些配基之间疏水作用的差异而实现分离。影响疏水膜色谱性能的主要因素有:盐离子的种类、离子强度、pH、柱温等。

杨利等^[16]以纤维素膜为介质,辛基为配基,分离牛血清白蛋白(BSA),并将实验结果与传统凝胶柱进行了比较,充分证明了HIMC的高效性。另外,他们还利用苯基HIMC对牛肝过氧化氢酶(BLC)进行了分离,使得产品比活性比粗品提高了11.8倍,回收率接近100%。

中科院大连化物所开发的以纤维素为基质的多种膜色谱介质^[17],所用配基为己二胺、甲基、戊烷和苯基等,干介质的配基载量最高可达 $40\mu\text{mol/g}$,介质对BSA的最大吸附量可达 50mg/g 。

Tennikova等^[18]以十二烷基甲基丙烯酸酯-GMA-EDMA共聚物(15:35:50)为基质,经 0.1ml/L 磺酸在 80°C 条件下处理5h,获得了疏水膜介质,用于分离肌球蛋白、核酸酶、溶菌酶和胰凝乳蛋白酶。由于采用了梯度洗脱,减少了分离时间和移动相的用量,从而降低了分离过程的成本,特别适用于制备级酶的分离。

2.5.3 离子交换膜色谱 (Ion exchange membrane chromatography, IMC)

离子交换膜色谱主要是利用膜介质表面的离子交换基团与目标蛋白等分子之间的离子交换作用实现分离的,主要用于蛋白质的分离纯化。根据离子交换基团的性质,可分为强酸型、弱酸型、强碱型、弱碱型。由商用膜改性制得的膜介质,其成本相对较低^[4]。在流速较慢的情况下,IMC可通过梯度洗脱分离蛋白质的混合物。离子交换膜色谱由于操作条件较温和,可以有效地保持蛋白质的活性,并能延长膜的使用寿命,其缺点是选择性稍差。

Podgornik等^[19]进行了IMC纯化质粒DNA和肽链等生物分子的研究,还比较了不同洗脱方式的分离效果。采用GMA-DEMA为基质,二乙氨乙基(DEAE)为离子交换基团,在 5ml/min 的流速下有效地分离了四种低聚核苷酸(长度分别为8,10,12和14个核苷酸),还在同样的基质接上 $-\text{SO}_3^-$ 基团后,用于肽链的分

离。

Dosio 等^[20]利用阳离子 IMC 从免疫毒素中分离出了未反应的单克隆抗体。与羟磷灰石 HPLC 相比,虽然二者的分离纯度差不多,但 IMC 分离步骤却大为简化。

Sasagawa 等^[21]通过射线引发接枝获得 GMA 膜,先在中空纤维膜上接入环氧基团,然后通过亚硫酸钠接入 SO_3H 基团,再与镁离子交联,制成离子交换膜介质,用于从蛋清中分离溶菌酶。以 $\text{NaHCO}_3\text{-NaOH}$ 缓冲液为洗脱液,在 pH 为 9.0 时洗脱率达到 100%。由于膜上螯合了 Mg^{2+} ,使得膜的透过速率也有较大增加。

杨利等^[17]以 QAE 型 IMC 分离纯化人尿激肽释放酶,由于采用了径向色谱技术,省去了传统的盐析和高速冷冻离心等步骤,大大节省了时间。

Sun 等^[22]采用纤维素膜共价连接 DEAE 的径向 IMC,从血浆的分离物(Nitschmann fraction III)中分离人凝血酶原,样品的通过速率为 20~30ml/min,在不降低分离效率的前提下,洗脱速率达到 40ml/min。这种膜还可用于 DNA、多肽和其它蛋白质的分离。

Zeng 等^[23]在甲壳素膜上偶联乙烯基乙二醇二缩水甘油醚(EGDE),获得了非常稳定的离子交换膜,这种膜可在酸或碱溶液中保持较高强度。他们采用三种低等电点(pI)的蛋白质(卵白蛋白、人血清白蛋白、胰岛素抑制剂)和两种高 pI 的蛋白质(溶菌酶、细胞色素)作为目标蛋白,分离两组中任意两种蛋白质的混合物,获得了很高纯度的产物(>99%)。这种膜适合于从重组蛋白质中分离带有较高负电荷的内毒素和核酸等物质。

2.5.4 多级膜色谱 (Multistage membrane chromatography)

为了获得更高的纯化效果,近年来还出现了多级膜色谱^[24-26],即不同类型的膜吸附剂组合在一起形成新的色谱柱。可以根据目标产物选择适当的膜介质排列顺序和洗脱方法,以便使上一层洗脱下来的目标蛋白能够被下一层吸附。多级膜色谱可以大大缩短混合产品的分离时间,有效地节省设备投资。

例如,由阳离子交换膜、染料配基亲和膜及阴离子交换膜构成的多级膜色谱可以纯化甲酸脱氢酶^[24]。由阴离子交换膜与阳离子交换膜构成的多级膜色谱可制备牛血清蛋白、IgG 及乳球蛋白等^[25]。由染料配基亲和膜、阴离子交换膜及肝

素亲和膜构成的多级膜色谱可以从大鼠细胞培养液中提取电泳级纯度的重组抗凝血酶III^[26]。采用阳离子交换膜与金属螯合膜组成的多级膜色谱可纯化尿激酶^[27]。

2.6 本章小结

膜色谱是膜技术与固定床色谱技术二者交叉结合的产物,膜色谱作为一种有竞争力的分离方法在生物分子的分离纯化中的应用日益增加。由于以多孔膜作为基质材料,膜色谱具有很多的潜在优势。然而,在应用膜色谱技术时应注意料液对膜的堵塞与污染,以防造成膜吸附剂的性能下降。

2.7 参考文献

- [1] C. Charcosset, Purification of Proteins by Membrane Chromatography, J. Chem. Technol. Biotechnol., 1998, 71: 95-110
- [2] Raja Ghosh, Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges J. Chromatography A, 2002, 952: 13-27
- [3] D. Keith Roper, Edwin N. Lightfoot, Separation of biomolecules using adsorptive membranes, J. Chromatography A, 1995, 702: 3-26
- [4] J. Thommes and M. R. Kula, Membrane Chromatography-An Integrative Concept in the Downstream Processing of Proteins Biotechnol. Prog. 1995, 11: 357-367
- [5] Elias Klein, Affinity membranes: a 10-year review J. Membrane Science, 2000, 179: 1-27
- [6] Guo W., Shang Z. et al, Membrane affinity chromatography of alkaline phosphatase, J. Chromatography A, 1994, 685: 344-348
- [7] 商振华、周良模 膜亲和色谱的现状、发展和应用, 化学进展, 1995, 7(1): 47-58
- [8] Charcosset, C., Su, Z., Karoor, S., Daun, G. & Colton, C. K., Protein A immunoaffinity hollow fiber membranes for immunoglobulin purification :

- experimental characterization. *Biotech. Bioeng.*, 1995,48 : 415-427.
- [9] T.B. Tennikova, M. Bleha, F. Svec, T.V. Almazova, B.G. Belenkii, High performance membrane Chromatography Of protein, a novel method of protein separation, *J. Chromatogr.*, 1991,555 :97-107
- [10] 陈欢林, 李静, 柴红, 金属螯合亲和膜吸附与纯化溶菌酶的研究, *高等学校化学学报*, 1999, 20(8):1322-1327
- [11] 时钧, 袁权, 高从阶, 膜技术手册, 北京: 化学工业出版社, 2001
- [12] Platonova G.A., Pankova G.A., Ilina I.Y. et al , Quantitative fast fractionation of a pool of polyclonal antibodies by immunoaffinity membrane chromatography, *J. Chromatography A*, 1999,852(1):129-140
- [13] Zeng X. F. Ruckenstein E., Macroporous chitin affinity membrane for wheat germ agglutinin purification from wheat-germ, *J. Membrane Sci.* , 1999,156(1):97-107
- [14] Zusman I., Gel fiber glass membranes for affinity chromatography columns and their application to cancer detection, *J. Chromatogr.B*, 1998,715:297-306
- [15] Castilho L. R., Deckwer W.D., Anspach F.B., Influence of matrix activation and polymer coating on the purification of human IgG with protein A affinity membrane, *J.Membrane Sci.*, 2000,172:269-277
- [16] 杨利, 陈小明, 贾凌云等, 疏水膜色谱法对生物大分子的快速纯化, *色谱*, 1999,17(4):335-337
- [17] 杨利, 贾凌云, 邹汉法等, 膜色谱技术及其在生化快速分离分析中的应用, *物工程进展*, ,1999,10(1):48-53
- [18] T.B. Tennikova, F. Svec, High performance membrane chromatography:highly efficient separation method for proteins in ion-exchange, hydrophobic interaction and reversed phase modes, *J. Chromatogr.*, 1993,646:279-288
- [19] Podgornik A, Barut M., Jancar J., High performance membrane chromatography of small molecules, *Anal. Chem*, 1999,71(15):2986-2991
- [20] Dosio F, Arpicco S, Canevari S, et al, Single step purification of immunotoxins containing a high ionic charge ribosome-inactivating protein clavin by carboxymethyl high performance membrane chromatography, *J. Chromatography*

- A, 1999,830(2):329-335
- [21] Sasagawa N, Saito K., Sugita K., et al, Ionic crosslinking of SO₃H group containing graft chains helps to capture lysozyme in a permeation mode, J. Chromatography A, 1999, 848(1):161-168
- [22] Sun T, Chen G., Liu Y., et al, Purification of human prothrombin from Nitschmann factor III using DEAE membrane radial flow chromatography, J. Chromatography B, 2000, 742:109-114
- [23] Zeng X. F. Ruckenstein E., Crosslinked macroporous chitosan anio-exchange membranes for protein separation, J. Membrane Sci., 1998, 148:195-205
- [24] Champluvier B, Kula M.R., Sequential membrane-based purification of proteins, applying the concept of multidimensional liquid chromatography, Bioseparation, 1992, (2):343-351
- [25] Freitag R, Splitt H, Reif O, Controlled mixed mode interaction chromatography on membrane adsorbers, J. Chromatography A, 1996, 728:129-137
- [26] Reif O W, Freitag R, Comparison of membrane adsorber based purification schemes for the downstream processing of recombinant h-ATIII, Bioseparation, 1994, 4:369-381
- [27] Hou K. et al, Purification of urokinase by combined cation exchanger and affinity chromatographic cartridges, J. Chromatogr. B, 1990, 525:297-306

第三章 离子交换树脂填充聚醚砜纤维吸附剂的制备与表征

摘要

为了解决膜吸附剂在操作过程中较易被污染的问题,本章提出了纤维吸附剂的概念,期望能够克服膜色谱和颗粒填充色谱的缺点。本研究以聚醚砜为基质材料、粉末型大孔离子交换吸附树脂为功能性微粒,采用外部液体调控相分离的方法,量身定做了表面具有开孔形态结构的离子交换树脂填充纤维吸附剂。本章重点研究了外部液体、树脂的种类和填充量等因素对纤维吸附剂形态结构的影响,考察了后处理方法对纤维吸附剂性能的作用,并以牛血清蛋白为模型物,对其吸附与脱附性能进行了初步研究。研究表明,具有开孔表面形态结构的树脂填充纤维吸附剂具有较好的吸附和脱附性能,作为色谱介质是可行而有效的。

3.1 概述

膜色谱组件是由一张或多张功能性膜片构成的,其功能相当于短而粗的色谱柱。按照功能分类,膜色谱可分为亲和膜色谱、离子交换膜色谱、固定化金属螯合膜色谱、疏水膜色谱及多级膜色谱等^[1],其中离子交换膜色谱是膜色谱中的一个大类,按照荷电基团的类型,它可分为磺酸类(S)、季铵盐类(Q)、二乙基胺乙基(DEAE)及磺丙基等(SP)。至今已报道了多种类型的膜色谱组件^[2-3],例如,平板式、中空纤维、螺旋卷式及折叠式等,其中有一些已得到较好的应用。

膜色谱技术主要用于蛋白质及单克隆抗体等生物大分子的浓缩以及热原、病毒等污染物的去除。有人称该方法是蛋白质下游处理的完整性技术^[4]。膜色谱作为一种有竞争力的分离方法在生物分子的分离纯化中的应用日益增加。

作为膜色谱介质,基质膜配基的导入可分为化学修饰法和物理法。化学修饰法是在膜的基质上或聚合物链上导入反应性配位基,已报道的大部分工作是用化学修饰方法制备膜色谱介质,并集中于现有膜的改性^[5]。所用配基为氨基酸、抗原-抗体配位基、染料配位基、金属螯合配基、离子交换配基等。

物理法是将功能性物质与基质材料通过各种方法杂化而引进功能性配基。由

于采用化学改性的方法制备膜吸附剂步骤繁琐并且不具有通用性,限制了大规模应用;采用物理方法制备膜吸附剂简单易行并具有通用性,但其分离纯化的选择性稍低。物理法制备的膜吸附剂特别适合于除去料液中的杂质,如热原及病毒等。近年来发展的颗粒填充型膜吸附剂(particle-loaded membrane adsorbers)就是采用物理的方法制备的^[6, 7]。其制备方法主要有烧结法和相分离法。

(1) 烧结法

烧结法是将功能性颗粒与基质材料烧结后制备而成^[6]。基质材料有聚四氟乙烯(PTFE)、玻璃纤维、聚氯乙烯(PVC)等。颗粒吸附剂为硅基类、苯乙烯与二乙烯基苯共聚物(SDB)、活性炭及离子交换树脂类等。在颗粒填充 PTFE 膜吸附剂中占重量 10%~20%的 PTFE 包裹 80%~90%的颗粒吸附剂,颗粒的大小直径约为 8 微米,其孔径约为 20Å。由于微小的颗粒具有较大的表面积且填充均匀,所以被分离样品可以在 10-100ml/min 流速范围内流动而没有沟流现象产生。

烧结法制备的颗粒填充型膜吸附剂主要用于生物分析样品的浓缩与纯化。

(2) 相分离法

Avramescu 等报道了采用相分离法制备颗粒填充型膜吸附剂^[7]。该法是通过功能性颗粒均匀地分散在聚合物多孔的基体中实现其功能性。采用该方法制备的膜吸附剂使微粒紧紧地被聚合物基体包裹着,具有吸附功能的微粒在膜中含量可达到 25%~75%。该方法的特点是容易为终端用户提供其所需的功能性配位基,通过选择不同的微粒与基质材料,可以构建各种功能性膜吸附剂。为此,Avramescu 等制备了具有离子交换功能的树脂填充 EVAL 平板膜吸附剂,并利用该膜对蛋白质混合物进行了分离纯化。由于采用温和的方法制备膜吸附剂,所以对功能性颗粒的耐热性无任何限制,其适用范围更为广泛。

综上所述,颗粒填充型膜吸附剂的优点是备压低、无沟流、样品容量大、重复性及再现性好、流速高、较少的脱附体积等;其缺点是当被分离的样品中含有较高浓度的大分子或悬浮物时该膜吸附剂易被污染堵塞。因此,在分离操作前要求过滤样品溶液。另一个值得注意的是,烧结法制备的膜吸附剂中的颗粒有可能在操作中泄漏出来而造成料液污染。

3.2 纤维吸附剂与纤维色谱概念的提出与探讨

3.2.1 纤维吸附剂与纤维色谱

为了解决膜吸附剂在操作过程中较易被污染的问题,本文提出了纤维色谱吸附剂的概念,它是一种用作色谱介质并且具有吸附功能的多孔性纤维,简称为纤维吸附剂。它可以通过化学或物理的方法将功能基团连接在纤维基体中的多孔壁上制备而成。

以纤维吸附剂作为色谱的介质,可组成各种构型的色谱柱,用于蛋白质分离,从而构成了一类新型的色谱技术,可称之为纤维色谱。目的是希望纤维色谱不仅能克服膜色谱与颗粒填充色谱的缺点,而且尽可能保留他们的优点。按照其作用功能,纤维色谱同样可分为亲合纤维色谱、离子交换纤维色谱、疏水纤维色谱及其他功能色谱等。

在纤维色谱系统中纤维色谱柱是其关键部件,由于纤维介质本身所具有的特点,纤维色谱柱与颗粒填充型色谱有很大不同,与膜色谱也有较大的区别。正在探索研究中的纤维色谱柱有管壳结构组件和螺旋线圈式组件等(由于此部分工作刚刚起步,有关纤维色谱柱的内容未在本论文中反映出来)。

与其它类色谱相比,纤维色谱具有如下特点:纤维吸附剂的形态结构易于调控,纤维直径可根据需要调节,易于规模放大,较好的抗污染操作性能。此外,纤维色谱可用于大规模地纯化与回收蛋白质,将特别适合于各种杂质的去除。由于纤维色谱作用机理更接近于颗粒填充型色谱,所以其缺点类似于颗粒填充型色谱。纤维色谱的不足主要包括:纤维吸附剂传质效率较低,动态吸附量较少。

3.2.2 颗粒填充纤维吸附剂

对于纤维吸附剂的研究,本研究以杂化纤维为研究平台,采用可控相分离的方法,通过选用不同的功能性物质,制备多种类型的填充纤维吸附剂,用于蛋白质分离纯化。

所谓填充纤维吸附剂是指功能性物质均匀地分散在纤维基体中而制备的纤维吸附剂。其中,功能性物质对目标物具有选择性作用,纤维基体是一种提供适宜孔径与通道的多孔性介质,它对目标物具有不吸附或低吸附特性,并且不影响功能性物质的活性。

为了降低溶质传质阻力,对颗粒填充纤维吸附剂的要求如下:(1)膜的形态结构:纤维表面是一种开孔结构(open pore structure),其孔径能满足溶质分子

的自由出入,但不允许微粒从吸附剂的多孔基体中泄露出来;纤维基体是一种相互连通的多孔结构,其孔径分布均匀且孔隙率较高;基体中功能性微粒之间应是相连通的并允许溶质自由出入。(2) 功能性微粒:填充量高、对目标物吸附容量大、粒径小而均匀。(3) 纤维的尺寸:纤维的直径尽可能地细,以便缩短溶质的传质路径并增加其表面积。(4) 基质材料:为降低生物大分子的非特异性吸附与变性,所选择的聚合物应是亲水性的并且净电荷尽量接近于零。

3.3 纤维吸附剂的制备方法

近年来,三孔式喷丝板(triple-orifice spinneret)纺丝技术的发展为中空纤维的制备提供了新的途径。其中,中间环隙挤出聚合物溶液,内芯通入芯液,外部环隙通入外部液体。通过选择不同的外部液体可制备多种结构的膜,如用于气体分离与渗透汽化的致密膜^[8, 9],用于超滤与微滤的多孔膜^[10, 11]。

He 等^[11]采用三孔式喷丝板纺丝技术制备了外表层孔径为微米级的中空纤维膜。根据相转化理论,当纺丝细流外表层聚合物浓度足够低时才能得到具有开孔特征的表层结构(open porous top-layer)。但如果聚合物溶液浓度过低,则难以纺丝成形。为此,He 等采用较高浓度聚合物溶液纺丝成形,同时采取适当措施以使挤出细流外表面的聚合物浓度降低,利用三孔式喷丝板纺丝技术制备了表皮具有开孔结构的中空纤维膜,其原理如图 3.3.1 所示。该方法是在聚合物溶液细流浸入凝固浴之前,先使某一溶剂与挤出的聚合物溶液细流外表层接触,溶剂扩散浸入聚合物细流内,从而使聚合物溶液细流外表层附近的聚合物浓度降低,即图 3.3.1 中的路径 A→B;此时聚合物本体溶液则保持起始的聚合物浓度,聚合物溶液细流通过凝固浴后发生了相分离,这就是图中的路径 B→C;由于聚合物细流外表层聚合物浓度降低,从而制备了表皮具有开孔结构的中空纤维膜。该方法的特点在于可以调控膜表层的形态结构,而对本体的结构影响不明显。三孔式喷丝板纺丝技术能很好地将上述两个过程结合起来同时完成,是制膜技术的重大突破,是对中空纤维形态结构进行可调定制的重大贡献。

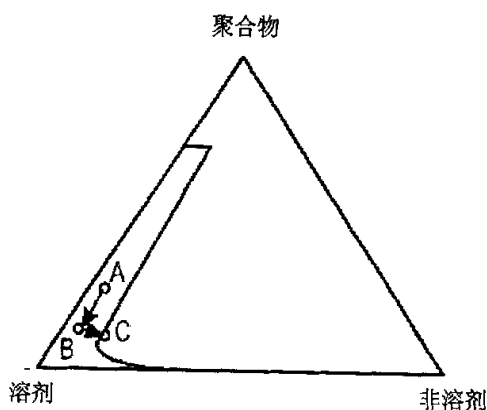


图 3.3.1 两步法过程中聚合物溶液细流表层组成变化示意图

路径 A→B：聚合物溶液细流外层与溶剂接触；路径 B→C：凝固浴中发生的相分离

如 3.2.2 节所述，理想的纤维吸附剂形态结构应该是其表皮具有开孔结构的多孔性纤维。为此，本工作借鉴相分离法制备颗粒填充膜吸附剂技术与三孔式喷丝板纺丝技术，采用外部液体调控相分离方法，达到制备具有上述结构特征的颗粒填充纤维吸附剂的目的。具体来讲，首先将聚合物溶液与功能性颗粒混合均匀制备纺丝液，然后经过特殊制作的喷丝板挤出后，选择使用合适的外部液体调控聚合物溶液的相分离过程，浸入凝固浴中沉淀成形，即可得到所需结构特征的纤维吸附剂。

本研究采用对蛋白质吸附较低的聚醚砜为基质材料，粉末型大孔离子交换吸附树脂为功能性微粒，采用可控相分离的方法，量身定做表面具有开孔形态结构的离子交换型树脂填充纤维吸附剂。重点集中于纤维吸附剂的形态结构研究，并以牛血清蛋白为模型物，对其吸附与脱附性能进行初步研究，以确认纤维吸附剂作为色谱介质的可行性与有效性。

3.4 实验部分

3.4.1 原材料

基质材料：聚醚砜（Polyethersulfone, PES）：型号 Ultrason[®]E6020P, Mw 约为 50000，由 BASF 制造。

功能性颗粒：Lewatit 阳离子交换树脂（Cation exchange resin, CER）：型号：

CNP80ws (弱酸型大孔阳离子交换树脂) 及 SP112ws (强酸型大孔阳离子交换树脂), 树脂均为粉末状, 平均粒径约 10 微米, 由 Bayer 公司提供。

添加剂及其它溶剂: 聚乙二醇 400 (PEG400) (合成级)、二乙二醇单乙醚 (DEGMEE) (合成级)、三缩四乙二醇 (TEEG) (合成级)、甘油 (CP)、丙酮 (AR)、乙醇(CP)、正己烷(CP), 这些试剂均由 Merck 公司提供。

溶剂: N-甲基吡咯烷酮 (NMP), 纯度 99%, 购自 Acros Organics 公司。

蛋白质模型物: 牛血清蛋白 (BSA): Fraction V, Sigma 提供。

新鲜的缓冲溶液用超纯水配制, 超纯水用 Millipore 公司 Milli-Q plus 纯水机制造, 其电导率为 $18\text{M}\Omega\cdot\text{CM}$ 。

以上所有物品未经进一步纯化直接使用。

3.4.2 树脂填充纤维吸附剂的制备

将不同量的 Lewatit 离子交换树脂粉末 (CNP80 或 SP112ws) (其性能见表 3.4.1) 缓慢加入到浓度为 10%~20% PES 的 NMP 溶液中, 搅拌均匀后, 静止放置过夜。PEG400 等作为添加剂调节纤维的形态结构。

如图 3.4.1 所示, 聚合物纺丝液从两孔喷丝板的中心管挤出, 外层环隙通入不同溶剂, 用于调控纤维的表面结构。纺丝液细流经过高度为 20mm 的空气间隙后直接进入水浴沉淀并发生相分离。所制备的纤维经水洗去除添加剂与溶剂后在空气中干燥存放。纺丝操作条件: 纺丝液温度、水浴温度及外部液体温度均为 20°C , 室内相对湿度: 40%, 纤维缠绕速度: 6-12m/min。

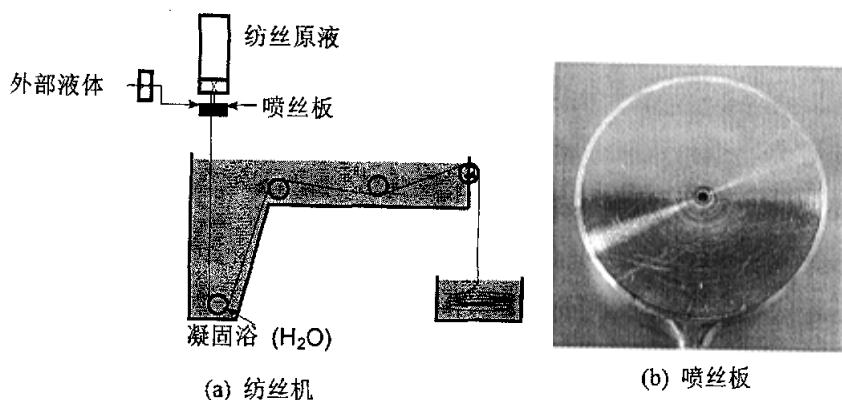


图 3.4.1 纺丝机与喷丝板

表 3.4.1 阳离子交换树脂的性能

树脂类型	功能基团	反离子形式	离子交换容量/(eq/l)	等电点(pI)
CNP80ws	-COO ⁻	H ⁺	4.3	~4.0
SP112ws	-SO ₃ ⁻	Na ⁺	1.75	~2.0

3.4.3 树脂填充纤维吸附剂的表征

3.4.3.1 纤维吸附剂形态结构

纤维吸附剂的形态结构用型号 JEOL JSM-T220A 扫描电镜 (SEM) 观察。样品的制备如下: 观察纤维的断面结构, 可以将新鲜的湿态纤维在液氮下冷冻後使其断裂, 样品在室温下真空干燥, 然后真空蒸镀一层薄金备用。

为了观察在工作环境下纤维的真实结构, 我们用低温扫描电镜技术 (Cryo-SEM) 观察湿态纤维的结构。首先, 样品被液氮冷冻后折断, 在液氮的保护下, 放置在液氮保护的低温样品室内, 在随后的观测中样品表面上的冰被低温真空升华后露出真实结构, 在低于-150℃温度下用 JEOL JSM-5600LV 场发射扫描电镜直接观察样品的形态结构。

3.4.3.2 孔隙率与吸水率

纤维吸附剂的孔隙率可由聚合物所占的体积与在水中平衡后纤维的体积之差与平衡后纤维的体积之比值计算得到。聚合物的体积用气体比重瓶法测定。三次试验的平均值为纤维吸附剂的孔隙率。

纤维吸附剂的吸水率可根据湿态下纤维平衡吸附的水重量与干态纤维的重量比值计算而得。

3.4.3.3 牛血清蛋白 (BSA) 浓度的测定

BSA 浓度可在 280nm 波长下用紫外可见光谱仪测定。本实验用 Philips PU 8720 UV/VIS 紫外可见光谱仪。

3.4.3.4 纤维吸附剂的蛋白质静态吸附容量

纤维吸附剂的蛋白质静态吸附容量可用牛血清蛋白的间歇实验确定。已知量的纤维吸附剂样品在 BSA 缓冲溶液中经一定时间浸泡平衡后 (本试验取 24 小时), 通过测量牛血清蛋白浓度的变化计算纤维吸附剂对蛋白质的静态吸附量,

单位是 mg BSA/g 吸附剂。在吸附实验中缓冲溶液采用 pH4.5,100mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液。料液蛋白质的浓度为 2mg/ml。

3.4.3.5 纤维吸附剂的蛋白质脱附

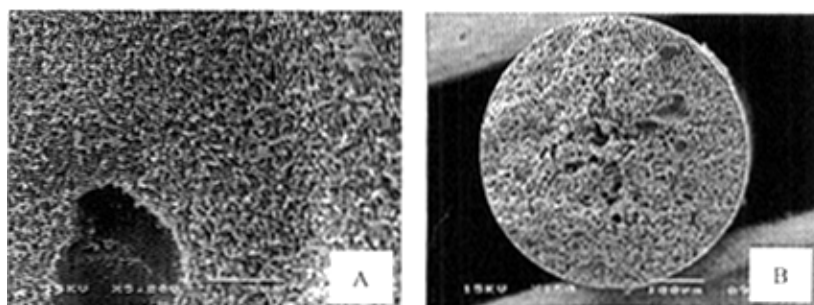
首先用 pH4.5,100mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液快速冲洗吸附蛋白后的纤维样品 3 次, 然后将其浸入 pH9.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液中使蛋白脱附。洗脱过程的 BSA 浓度也用上述方法在 280nm 检测。

所有的吸附与脱附试验均在 20℃ 的恒温振荡机内振动状态下完成的, 振动的频率是 100 次/分钟。

3.5 结果与讨论

3.5.1 纤维吸附剂的形态结构及其外部液体的影响

如图 3.5.1 所示, 使用外部液体制备了表面具有开孔结构的多孔性树脂填充纤维吸附剂(图 3.5.1A)。阳离子交换树脂 CNP80ws 在纤维吸附剂基体内较为均匀分布(图 3.5.1B), 由于多孔皮层的保护填充在纤维基体中的树脂颗粒在操作过程中难以泄漏。从图 3.5.1C 中可以发现, 在树脂颗粒周围存在一定体积的自由空间, 并且它们之间是连通的(图 3.5.1D)。从这些 SEM 照片可以推测这种结构将允许溶质分子以较低的扩散阻力从本体溶液进入纤维内部。另外, 由图 3.5.1E 和图 3.5.1F 可知, 与纯树脂表面形态结构相比, 纤维基体内树脂颗粒的表面结构清晰并基本保持了原样。



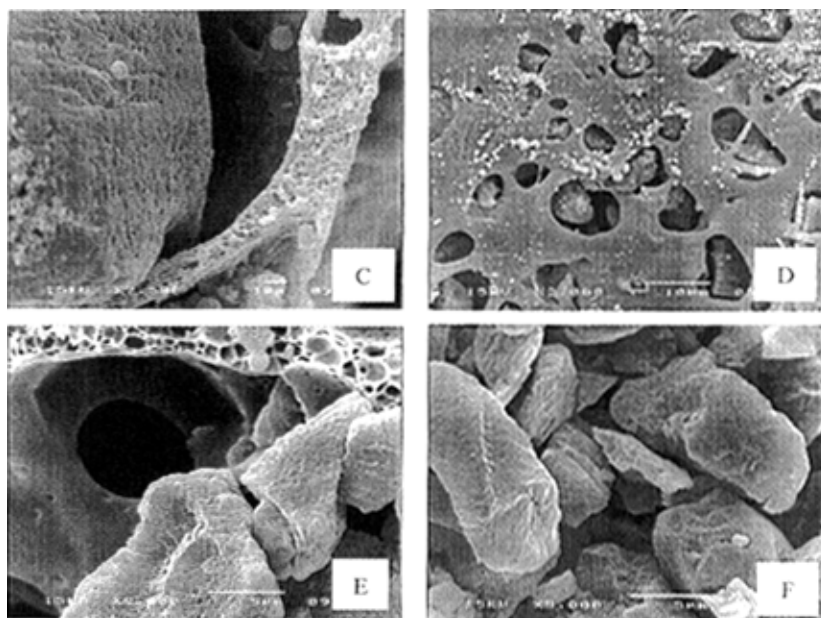


图 3.5.1 阳离子交换树脂填充 PES 纤维吸附剂的 SEM 照片

A: 纤维的表面; B: 纤维的横断面; C: 纤维的横断面(树脂颗粒与聚合物基体之间的空间); D: 纤维的横断面(颗粒之间的连接通道); E: 纤维的横断面(包裹在基体内的树脂颗粒); F: 纯树脂 CNP80ws 颗粒表面 [CER(CNP80ws)填充量 50wt%; 外部液体: NMP/H₂O=9/1; 纤维直径 0.5mm]

如本章 3.3 节所述, 外部液体的使用改变了纤维成形过程中的聚合物溶液相分离路径, 为了制备具有表面开孔结构的纤维吸附剂, 我们研究了不同外部液体对纤维表面结构的影响。图 3.5.2 表明, 外部溶剂对纤维形态结构有很大的影响。当 DEGMEE、TEEG、丙酮及高浓度 NMP 作为外部液体时, 得到了表面开孔的纤维, 其表面孔径可达到微米级。

如图 3.5.3 所示, 当以 NMP/水混合物为外部液体时, 纤维的表面结构趋于疏松。这是因为外部液体中溶剂 NMP 含量提高, 使纺丝细流相分离速度变慢, 表面的孔径倾向变大; 当 NMP/水混合液中 NMP 含量较高且在与聚合物溶液相接触过程中不能使之分相时, 该混合物中 NMP 溶剂将稀释细流表皮附近的聚合物溶液, 经过相分离后, 在纤维吸附剂表面形成了开孔结构。然而, 当外部液体为纯溶剂 NMP 时, 令人奇怪的是表面开孔结构并未出现, 这表明外部液体混合物中一定量水的存在有助于相转变中形成表皮具有开孔结构的纤维吸附剂。

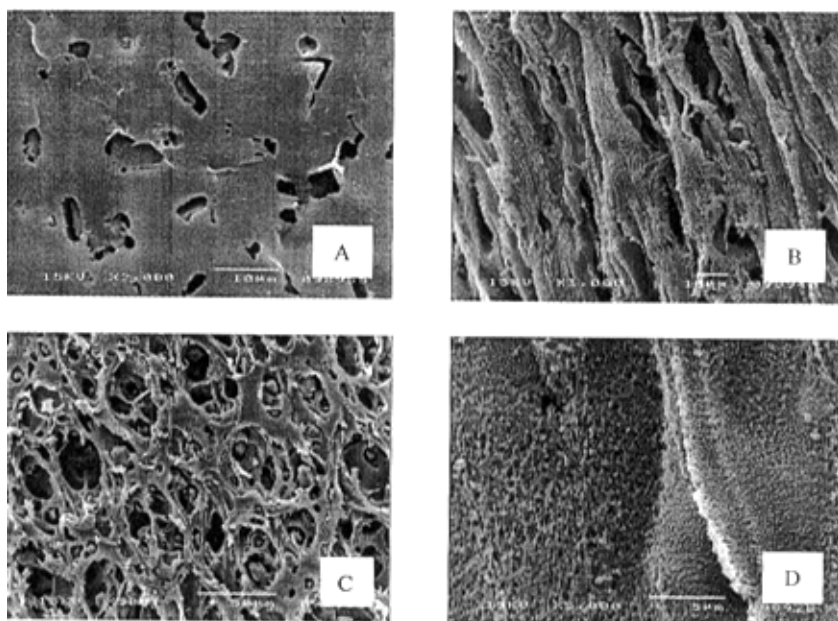


图 3.5.2 外部液体对纤维吸附剂表面形态结构的影响

A-未用; B-DEGMEE, C-丙酮; D-TEEG
[CER(CNP80WS)填充量 50wt%; 纤维直径 0.5mm]

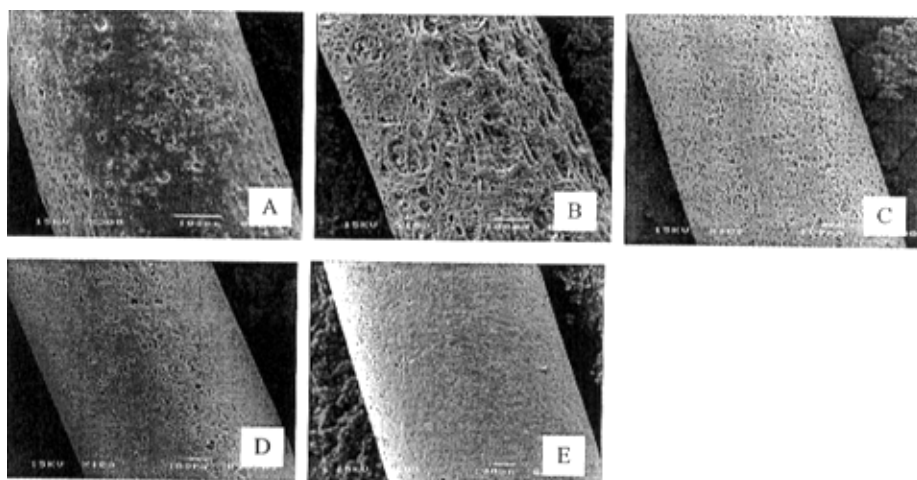


图 3.5.3 外部液体 NMP/水混合液对纤维吸附剂形态结构的影响

A-NMP; B-NMP/H₂O=90/10; C- NMP/ H₂O =70/30; D- NMP/ H₂O =30/70; E- H₂O
[(CER(CNP80WS)填充量 50wt%; 纤维直径 0.5mm)]

3.5.2 树脂填充 PES 纤维吸附剂与 PES 纤维的比较

外部液体对未填充树脂的 PES 纤维形态结构的影响如图 3.5.4 所示。一些溶剂如丙酮、DEGMEE、TEEG 以及溶剂含量较高的 NMP/水混合液能使纤维表面更加粗糙并产生开孔结构。其原因是纺丝细流在进入水浴沉淀之前外部溶剂稀释了细流外表面聚合物溶液，从而在相转变过程中形成了粗糙而开孔的表面结构。

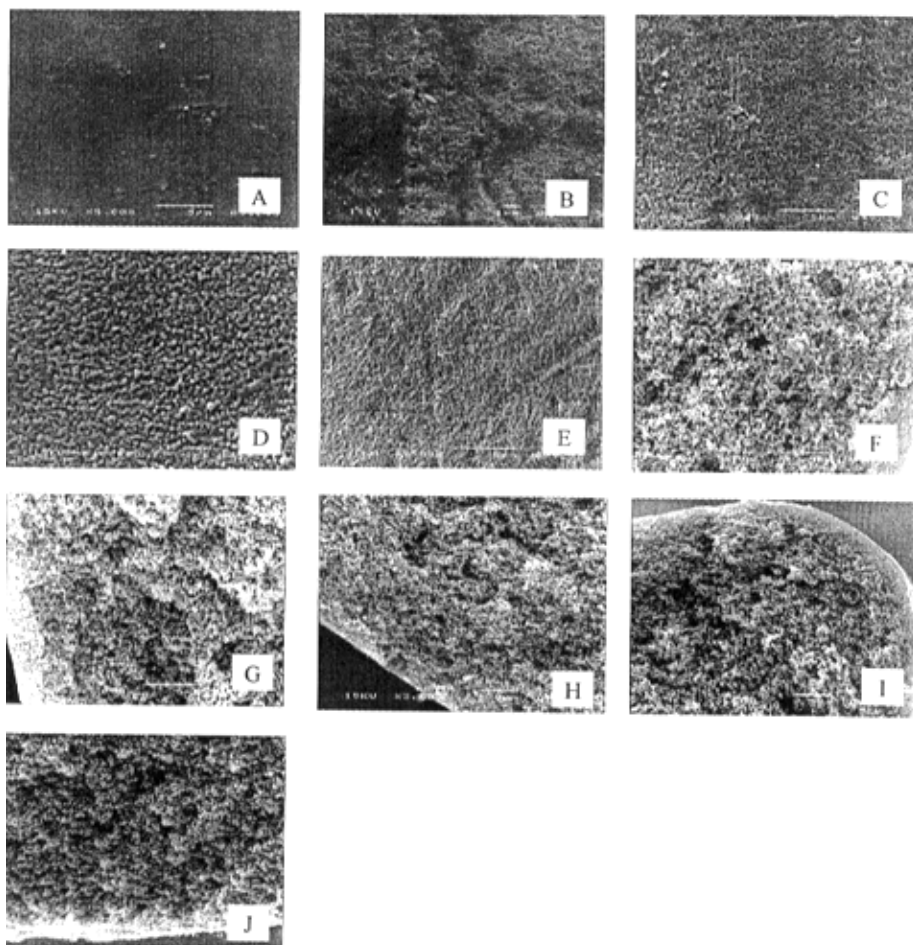


图 3.5.4 外部液体对纯 PES 纤维形态结构的影响

PES 纤维表面: A-未用; B- DEGMEE; C-丙酮; D- TEEG; E- NMP/水=90/10;

PES 纤维横断面: F-未用; G- DEGMEE; H-丙酮; I- TEEG; J- NMP/水=90/10

与纯 PES 纤维形态结构相比，树脂颗粒填充纤维吸附剂形态结构有以下特

(1) 树脂填充纤维吸附剂的表面更粗糙，表面的孔结构表现得更加开放，孔径更大。这是由于当填充树脂颗粒时纺丝液很粘稠，而且颗粒具有一定支撑作用，在外部液体流的机械冲刷与稀释作用下使纺丝细流的外表面变得粗糙，所以纤维成形后在纤维的表面形成了粗糙的开孔结构。

(2) 图 3.5.5 表明无论在干态还是在湿态下树脂填充纤维吸附剂内树脂颗粒周围都存在自由空间。这样的空间应该是溶质如蛋白质等进入纤维基体的自由通道。

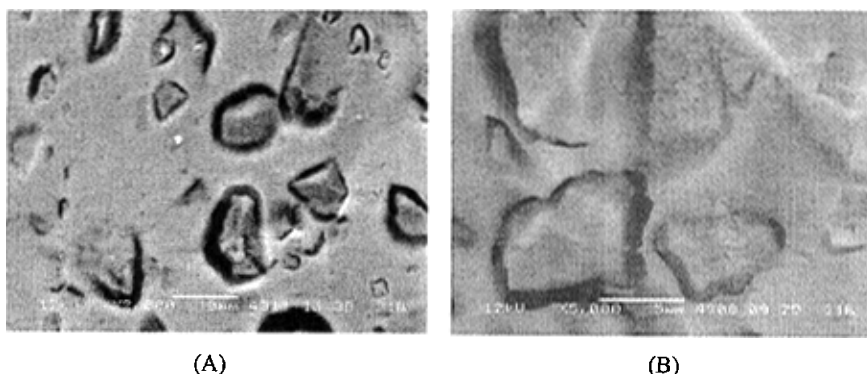


图 3.5.5 湿态下纤维吸附剂的低温 SEM 照片

(A) 表面, (B)横截面;

[CER(CNP80WS)填充量 50wt%; 纤维直径 0.5mm, 未使用外部液体]

(3) 无树脂填充的 PES 纤维基体结构是非常疏松且相互连通的 (图 3.5.4F~J), 而树脂填充纤维吸附剂的空隙率较低, 且整个基体不是完全连通的。

(4) 树脂颗粒的填充对聚合物的相分离过程可以产生影响。从 SEM 照片中可以发现树脂的加入改变了相分离进行方向 (图 3.5.6)。在树脂填充纤维吸附剂成形过程中, 当相分离的前沿遇到了颗粒 (特别大尺寸的颗粒) 时, 由于聚合物溶液粘度较高, 此时相分离进程将被迫终止。接下来的相分离过程将沿着其他方向继续进行, 树脂颗粒限制了相分离进程中大空腔的空间扩展, 在某些情况下, 相分离方向可能沿着轴相方向进行的。因此, 可以设想, 纳米的掺杂将对吸附剂的制备是一个有益的尝试。然而, 至今对于颗粒在相分离过程的作用我们知之甚少, 这是一个有趣的课题, 值得进一步研究。

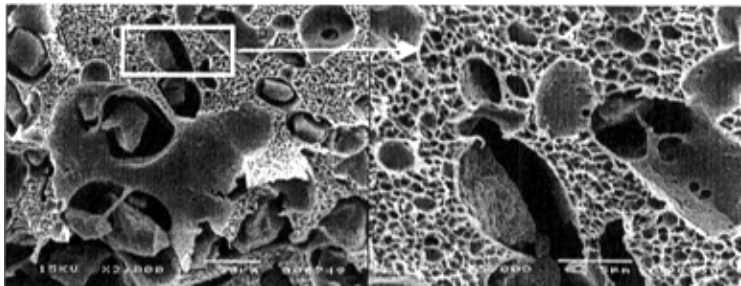


图 3.5.6 纤维吸附剂横断面的 SEM 照片

[CER(CNP80WS)填充量 50wt%；纤维直径 0.5mm，未用外部液体]

(5) 表 3.5.1 和表 3.5.2 列出了在不同的外部液体条件下树脂填充纤维吸附剂与 PES 纤维的吸水率和孔隙率。树脂掺杂后纤维的吸水率和孔隙率都变小，其中一个原因是树脂掺杂后纺丝液固含量提高而粘度增大，成形后纤维结构较为致密，孔隙率降低。然而，由于阳离子交换树脂具有较强的吸水性，树脂的加入大大改善了纤维吸附剂的再润湿性能，所以在重新润湿时树脂填充纤维吸附剂吸水量大并且吸水速率较快。

表 3.5.1 外部液体对树脂填充纤维吸附剂吸水率和孔隙率的影响

[CER(CNP80WS)填充量 50wt%；纤维直径 0.5mm]

外部液体		未用	DEGMEE	丙酮	TEEG
吸水率	湿态	142	152	160	143
	再润湿态*	118	125	129	117
孔隙率	湿态	60.8	63.2	69.4	68.8
	再润湿态	56.1	57	67	65.5

*)再润湿态: 干燥后再用缓冲溶液润湿

表 3.5.2 外部液体对 PES 纤维吸水率和孔隙率的影响

外部液体		未用	DEGMEE	丙酮	TEEG
吸水率/%	湿态	284	253	250	280
	再润湿态	37	46.8	45.9	48.8
孔隙率/%	湿态	73.4	66.5	69.6	75
	再润湿态	71	64.9	68.2	75

3.5.3 离子交换树脂种类与填充量对纤维吸附剂形态结构的影响

图 3.5.7(1)为使用外部液体成形的阳离子交换树脂 SP112ws 填充纤维吸附剂 SEM 结果。与相同填充量的树脂 CNP80ws 填充纤维吸附剂相比 (图 3.5.2), 树脂 SP112ws 填充纤维吸附剂的表面较为平滑, 实验所用的两种树脂含量、平均粒度及其分布均是相同的, 其中树脂 CNP80ws 是含交换基团-COOH 的弱酸性阳离子交换树脂, 而树脂 SP112ws 是含交换基团-SO₃H 的强酸性阳离子交换树脂。实验中发现, 含树脂 SP112ws 的纺丝液粘度比相同含量的 CNP80ws 树脂要低, 其流变性能较好, 这不仅有利于形成较为平滑的表面, 更容易形成尺寸较大的空腔, 如图 3.5.7 (2) 所示。

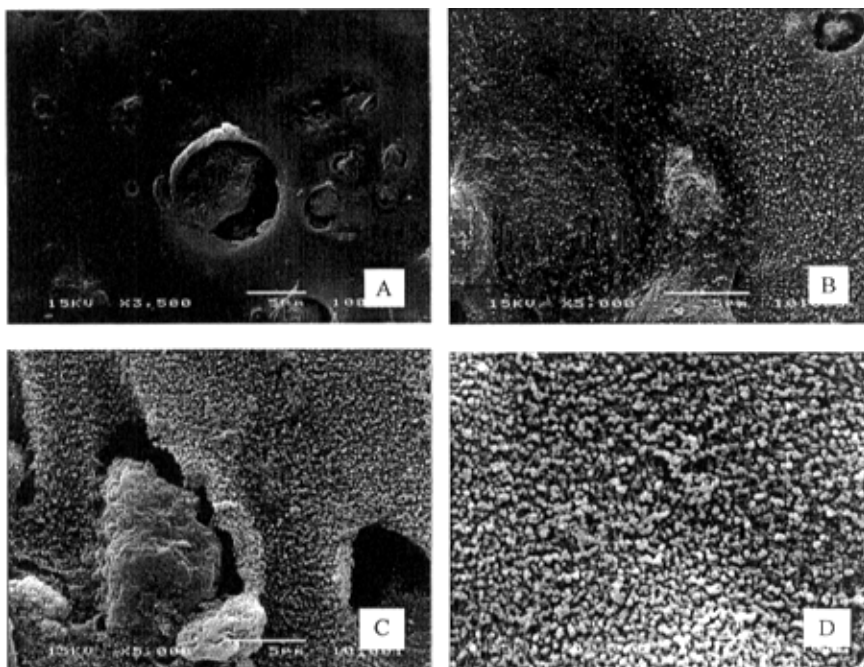


图 3.5.7(1) 树脂 SP112ws 填充纤维吸附剂的表面形态结构

外部液体: A-未用; B-DEGMEE; C-丙酮; D-TEEG
[CER(SP112ws)填充量 50wt%;纤维直径 0.5mm]

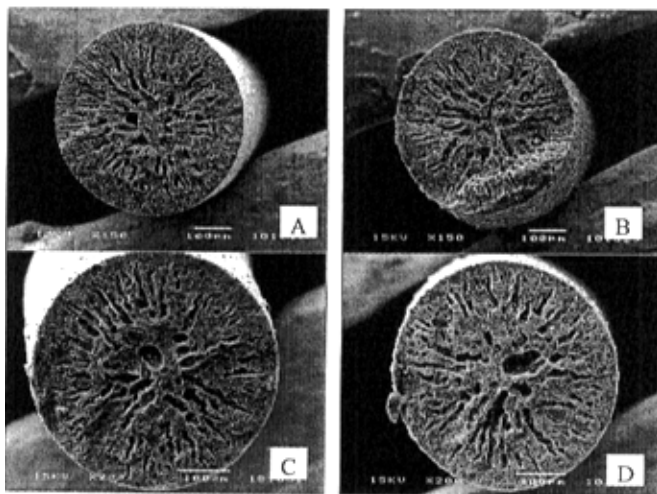


图 3.5.7(2) 树脂 SP112ws 填充纤维吸附剂的横截面形态结构

[CER(SP112ws)填充 50wt%] 外部液体: A-未用; B-DEGMEE; C-丙酮; D-TEEG

如图 3.5.8(1)所示, 当外部液体采用 DEGMEE 时, 随树脂 CNP80ws 填充量的提高, 纤维吸附剂表面粗糙度增大。随树脂填充量增加, 纺丝液粘度变大而聚合物相对量减少, 当纺丝细流接触外部溶液后外表皮聚合物浓度较低, 结果形成了更加粗糙的表皮结构。然而, 当不使用外部溶剂时, 树脂的填充量对纤维表面的粗糙度影响不明显[图 3.5.8 (2)]。图 3.5.9 表明, 树脂填充量较低, 在纤维吸附剂横截面易形成指状空腔结构。

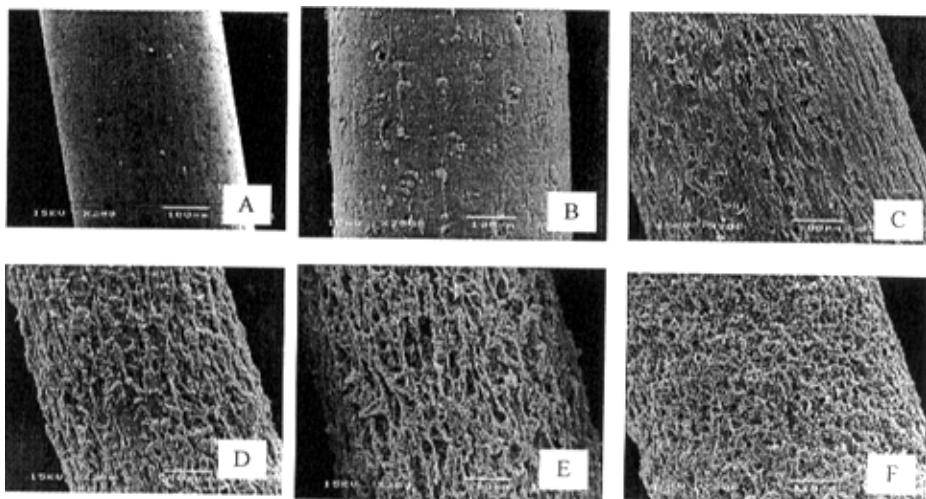


图 3.5.8(1) 不同树脂填充量的纤维吸附剂表面形态结构[CER(CNP80WS)填充量 50wt%; 外部液体: DEGMEE] 树脂填充量: A-10%; B-30%; C-50%; D-60%; E-75%;F-85%

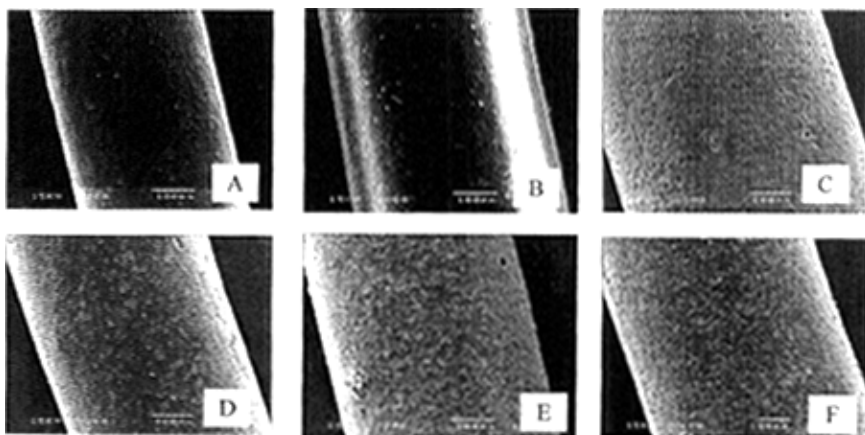


图 3.5.8 (2) 不同树脂填充量的纤维吸附剂表面形态结构

树脂填充量: A-10%; B-30%; C-50%; D-60%; E-75%; F-85%

[CER(CNP80WS)填充量 50wt%; 纤维直径 0.5mm; 未用外部液体]

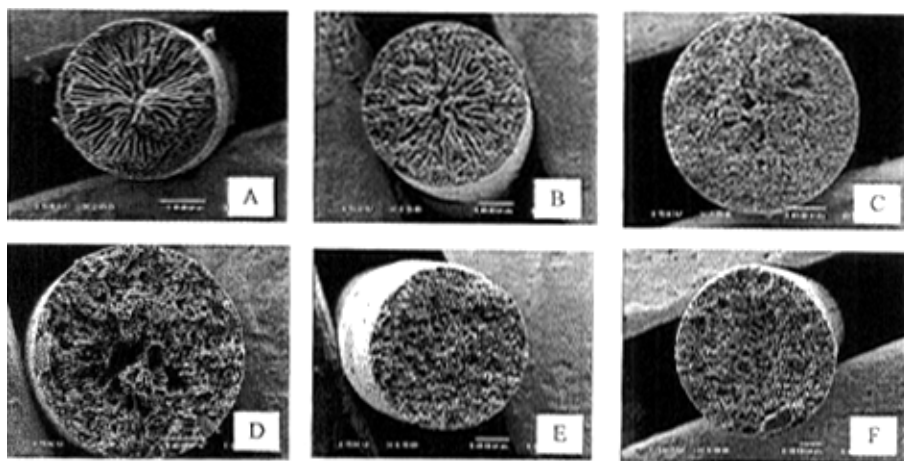


图 3.5.9 不同树脂填充量的吸附剂横截面形态结构

树脂填充量: A-10%; B-30%; C-50%; D-60%; E-75%; F-85%

[CER(CNP80WS)填充量 50wt%; 纤维直径 0.5mm; 未用外部液体]

3.5.4 后处理方法对树脂填充纤维吸附剂的影响

纤维吸附剂的储存是产品制造过程中的一个重要问题。在纤维后处理过程中既要保持纤维的原来形态又要尽可能保持其湿态性能。常用的处理方法为湿态保存、干燥、经专用处理剂处理后干燥及热处理等。

图 3.5.10 表明, 经过 40%甘油水溶液处理 24 小时后纤维吸附剂形态结构变化不明显。但如果在干燥前先分别经过乙醇和己烷连续处理后, 纤维吸附剂表面变得粗糙且树脂颗粒周围的空间略有缩小 (图 3.5.11)。

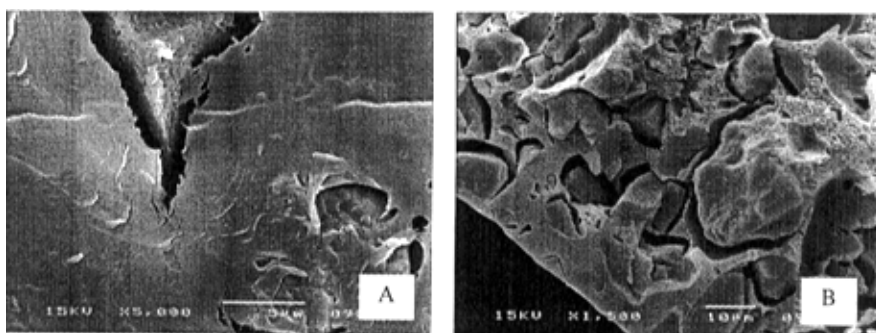


图 3.5.10 甘油水溶液处理后纤维吸附剂 SEM 照片[CER(CNP80WS)填充量 50wt%; 纤维直径 0.5mm, 未用外部液体]: (A) 表面; (B) 横截面

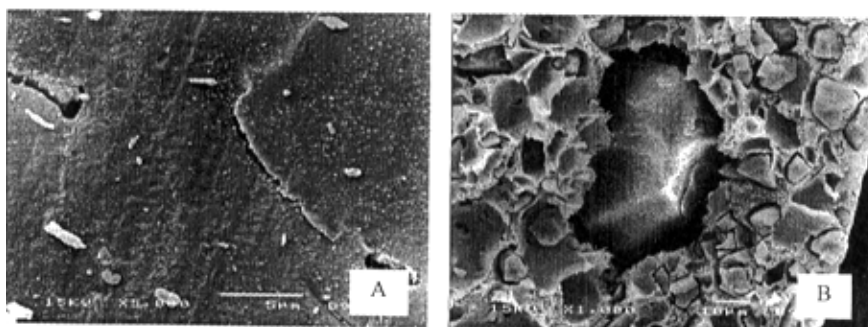


图 3.5.11 乙醇和己烷连续处理后纤维吸附剂 SEM 照片[CER(CNP80WS)填充量 50wt%;纤维直径 0.5mm, 未用外部液体]: (A) 表面; (B) 横截面

表 3.5.3 列出了不同处理方法对纤维吸附剂尺寸稳定性的影响。从表中可以看到, 经甘油水溶液处理后纤维吸附剂形状基本得以保持。但乙醇和己烷连续处理后纤维吸附剂的形状收缩较大, 这是由于经乙醇和己烷连续处理后聚醚砜在己烷中被溶胀, 使纤维吸附剂基体发生了收缩。采用直接干燥处理的方法, 纤维吸附剂的直径与长度变化不超过 5%, 干燥的纤维重新湿润后形状几乎无多少变化。另外, 无树脂掺杂的 PES 纤维具有相似的情形 (表 3.5.4), 但干燥后纤维的吸水率明显降低 (表 3.5.2)。这说明干燥后多孔的 PES 纤维基体疏水性增加而再润湿性下降。

表 3.5.3 后处理方法对纤维吸附剂尺寸的影响

外部液体	未用			DEGMEE		
后处理方法	自然干燥	40wt%甘油处理	乙醇/己烷处理	自然干燥	40wt%甘油处理	乙醇/己烷处理
$\Delta D^1/\%$	-5	0	-6	-3.6	0	
$\Delta L^2/\%$	-1	0	-3.3	-1	0	

1) ΔD 代表从湿态至干态纤维直径变化率

2) ΔL 代表从湿态至干态纤维长度变化率

表 3.5.4 不同状态下无树脂填充 PES 纤维的尺寸变化*

外部液体	未用	DEGMEE	丙酮	TEEG
$\Delta D/\%$				
湿态至干态	-2	-2	-2	0
干态至再湿润态	0	0	0	0
$\Delta L/\%$				
湿态至干态	-1.5	0	0	-0.5
干态至再湿润态	1.3	0	0	0.5

* 处理方法：湿态→干燥→再润湿

3.5.5 树脂填充纤维吸附剂与其他类型吸附剂的比较

树脂填充纤维吸附剂对蛋白质的吸附性能可用静态吸附容量来表征。在本工作中牛血清蛋白作模型蛋白质，吸附剂的静态吸附容量可由间歇吸附实验来完成。图 3.5.12 表明不同表面形态结构的树脂 CNP80ws 填充 PES 纤维吸附剂具有不同的吸附容量。从 SEM 照片可知，DEGMEE 类纤维吸附剂具有开孔的表面结构，这种结构使纤维吸附剂对 BSA 吸附不仅容量大而且吸附速率快。图 3.5.13 是蛋白质 BSA 与不同类型吸附剂的复合体在接触洗脱液后脱附实验的结果。可以看出，具有开孔表面结构的纤维吸附剂与蛋白的复合物更容易解离。不同的树脂填充纤维吸附剂对蛋白质的吸附与脱附的性能列于表 3.5.5。有关纤维吸附剂对蛋白质的吸附性能研究详见第 4 章和第 5 章。

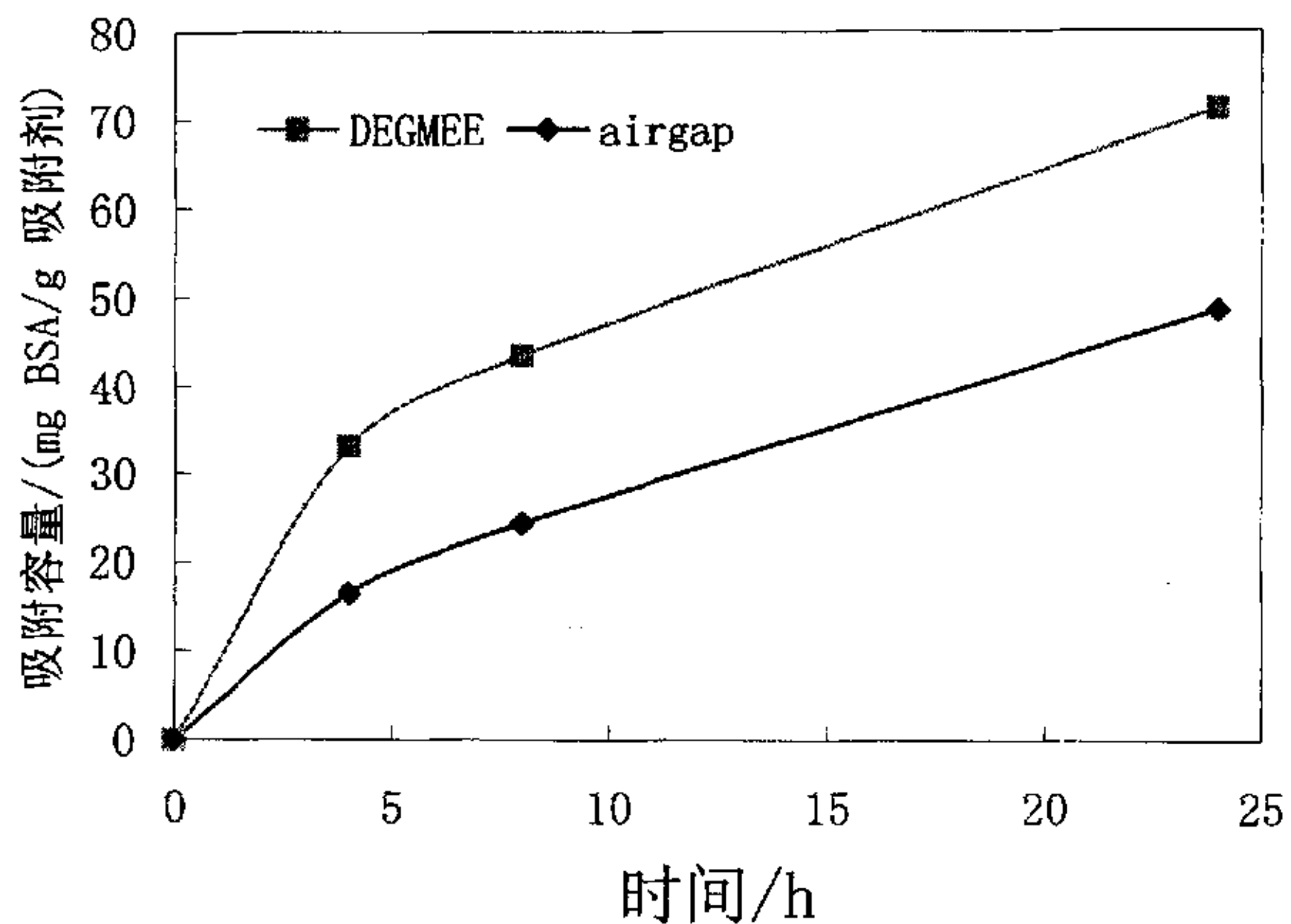


图 3.5.12 不同表面形态结构的树脂填充纤维吸附剂的吸附性能[CER(CNP80WS) 填充量 50wt%; 纤维直径 0.5mm]: airgap: 未用外部液体; DEGMEE: DEGMEE 为外部液体

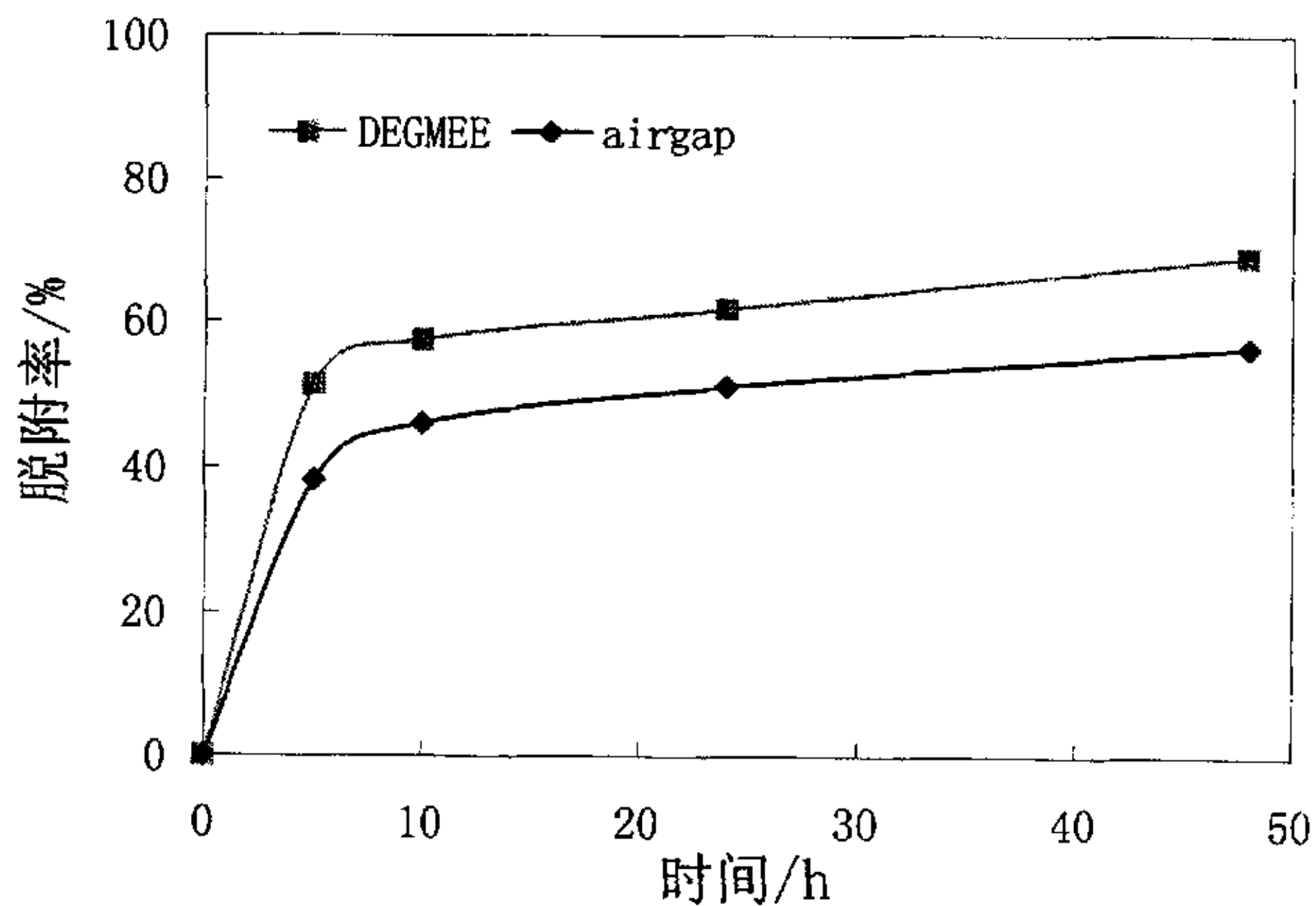


图 3.5.13 不同表面形态结构的树脂填充纤维吸附剂的脱附性能[CER(CNP80WS) 填充量 50wt%; 纤维直径 0.5mm]: airgap: 未用外部液体; DEGMEE: DEGMEE 用作外部液体

表 3.5.5 不同表面形态结构的树脂 CNP80ws 填充纤维吸附剂的吸附与脱附性能*

外部液体	静态吸附容量/(mg BSA/g 吸附剂)	脱附率/%
未用	53.5	56.5
DEGMEE	68.2	65.8
丙酮	78.5	65.5
TEEG	75.3	63.3

*) CER(CNP80WS)填充量 50wt%，吸附时间 24hrs.

如表 3.5.6 所示，与树脂掺杂 EVAL 膜吸附剂相比，纤维吸附剂具有相当的吸附容量，并且略高于纯离子交换树脂的蛋白质吸附容量（有关解释详见第 4 章），表明这种纤维状色谱介质吸附功能可与其它类型色谱介质相媲美。可以相信，这种表面具有开孔结构的离子交换树脂填充纤维吸附剂用作离子交换色谱的介质是可行的。

表 3.5.6 各种类型吸附剂的吸附性能

吸附剂类型	吸附容量	
	mg BSA/g 树脂	mg BSA/g 吸附剂
阳离子交换树脂(CER CNP80ws)	110±10	
树脂 CNP80ws 填充 PES 纤维吸附剂 (树脂填充量 50%)	136±15	68±10
树脂 CNP80ws 填充 EVAL 膜吸附剂 ^[7]	树脂填充量 25%	130±10
	树脂填充量 65%	131±11
	树脂填充量 75%	126±13
		30±5
		85±8
		95±10

3.6 本章小结

(1) 采用外部液体如 DEGMEE, TEEG, NMP/水及丙酮等改变了纤维成形过程中的聚合物溶液相分离路径，达到了调控纤维吸附剂表面形态结构的目的。通过可控相转化方法成功制备了基体为多孔性的且表面具有开孔结构的树脂填充 PES 纤维吸附剂。

(2) 与填充树脂 CNP80ws 相比, 在同样的制备条件下树脂 SP112ws 填充纤维吸附剂的表面较为平滑, 在其断面上易形成指状空腔结构。较高树脂填充量有助于形成具有粗糙表面结构的纤维吸附剂。

(3) 具有开孔表面结构的树脂填充纤维吸附剂具有较好的吸附和脱附性能, 它有利于蛋白质类溶质的传质。树脂填充纤维吸附剂与文献报道的膜吸附剂相比具有相当的静态吸附容量, 可与其它类型色谱介质相媲美, 表面具有开孔结构的离子交换树脂填充纤维吸附剂用作离子交换色谱的介质是可行的。

3.7 参考文献

- 1) Raja Ghosh, Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges J. Chromatography A, 952 (2002) 13-27
- 2) D. Keith Roper, Edwin N. Lightfoot, Separation of biomolecules using adsorptive membranes, J. Chromatography A, 702(1995) 3-26
- 3) Catherine Charcosset, Purification of Proteins by Membrane Chromatography, J. Chem. Technol. Biotechnol. 71(1998) 95-110
- 4) J. Thommes and M. R. Kula, Membrane Chromatography-An Integrative Concept in the Downstream Processing of Proteins Biotechnol. Prog. 11 (1995) 357-367
- 5) Elias Klein, Affinity membranes: a 10-year review J. Membrane Sci. 179 (2000) 1-27
- 6) Henk Lingeman, Sacha J.F. Hoekstra-Oussoren; Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean up in bioanalysis; J. Chromatography B, 689(1997) 221-237
- 7) M. Avramescu Membrane adsorbents development and applications PhD thesis, University of Twente (2002)
- 8) S.-G. Li, G. H. Koops, M. H. V. Mulder, T. van den Boomgaard, and C.A. Smolders, Wet spinning of integrally skinned hollow fiber membranes by a modified dual-bath coagulation method using a triple orifice spinneret, J. Membrane Sci., 94 (1994) 329-340.

- 9) G. H. Koops, J. A. M. Nolten, M. H. V. Mulder, and C. A. Smolders, Integrally skinned polysulfone hollow fiber membranes for pervaporation, *J. Appl. Polym. Sci.*, 54 (1994) 385-404.
- 10) I. M. Wienk, H. A. Teunis, T. v. d. Boomgaard, and C. A. Smolders, A new spinning technique for hollow fiber ultrafiltration membranes, *J. Membrane Sci.*, 78 (1993) 93-100.
- 11) T. He , M.H.V.Mulder, H. Strathmann, M. Wessling, *J. Membrane Sci.*,207(2002) 143-156

第四章 树脂填充 PES 纤维吸附剂的吸附与脱附性能研究

摘要

本章主要研究了树脂填充纤维吸附剂与模型蛋白质之间的吸附与脱附性能。探讨了吸附剂表面形态结构、填充树脂种类、树脂填充量、纤维直径、吸附剂状态等因素对吸附剂吸附与脱附性能的影响,分析了蛋白质吸附热力学与动力学过程,并对蛋白质传质机理进行了初步探讨。研究表明,表面具有开孔结构的树脂填充纤维吸附剂有较好的吸附与脱附性能,其蛋白质吸附容量为 68.2~93.2mg BSA/g 吸附剂(树脂填充量 50%);蛋白质在树脂填充纤维吸附剂中的吸附过程符合朗格缪尔吸附模型;表面具有开孔结构纤维吸附剂的吸附速率与纯树脂相当,并具有较低的传质阻力。

4.1 概述

4.1.1 膜色谱

膜色谱是膜技术与固定床色谱技术二者交叉结合的产物^[1~5]。由于以多孔膜作为基质材料,膜色谱具有很多的特点。例如,料液流动快、溶质停留时间短、膜色谱柱的跨膜压差较低、具有较高蛋白质吸附容量、蛋白质回收率高、膜色谱可以线性规模放大、膜色谱柱系统可以进行就地清洗(Clean In Place)操作^[6]。

如第三章所述,纤维色谱的概念是在膜色谱基础上提出来的,用于解决在操作过程中膜色谱易被污染的问题。为此,我们研制了表面具有开孔结构的离子交换型树脂填充 PES 纤维吸附剂(见第三章)。本章重点研究不同形态结构的树脂填充 PES 纤维吸附剂与模型蛋白质牛血清蛋白(BSA)之间的吸附与脱附行为。

4.1.2 溶质的传质机理

4.1.2.1 颗粒填充色谱

颗粒填充色谱的传质过程是由三个步骤构成的,即颗粒表面的膜扩散(film diffusion)、孔隙内的孔扩散(pore diffusion)以及溶质与孔隙内表面配基或其他结合点的结合动力学(the binding kinetics)。一般来讲,颗粒内的孔扩散是速率控制步骤。这主要是大分子传递移动较慢的缘故,当存在空间位阻时更加明显。填充色谱的传质机理已有许多研究报道。

4.1.2.2 膜色谱^[2-3]

膜色谱的传质过程一般包括：穿过膜孔的对流过程（convection）、膜孔内的膜扩散(film diffusion)、溶质与膜孔内表面的配基或其他结合点的结合动力学（the binding kinetics）。

在膜色谱的传质过程中，溶质与基体的作用不是发生在颗粒的死端孔内，而是在膜的通孔内。在死端孔内的传质是通过扩散来实现的，而在通孔内的传质是通过对流来实现的。由于消除了孔内扩散，使溶质进入膜基体内的传质阻力明显地降低。

4.1.2.3 等温吸附曲线

已有很多热力学模型例如线性模型、朗格缪尔(Langmuir)模型、双朗格缪尔模型、Freundlich 模型、Freundlich-Langmuir 模型等提出用来描述溶质在固体上的吸附过程^[6-7]。对于蛋白质在离子交换树脂上的吸附，最常用的模型是朗格缪尔等温吸附模型，该模型假设在被吸附溶质与吸附点之间的反应是可逆的，并且在被吸附分子之间无永久性的相互作用发生。

4.1.2.4 有效扩散系数

吸附过程的初始阶段被认为是由扩散过程控制，扩散过程扩散速率的定量测量是用扩散系数来表示。蛋白质穿过蛋白质水溶液与膜界面的通量可以考虑为蛋白质从半无限介质（semi-infinite）扩散到一个平板（Plate）的过程。在这种简化的情形下，依据 Fick 第二定律，可推导出方程（1）。从这个方程式可知，在扩散控制的情形下蛋白质吸附量与时间的平方根成线性关系。按照方程（1）可计算出有效扩散系数 $\bar{D}$ ^[9, 10]。

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{4}{\sqrt{\pi}} \cdot \sqrt{\frac{\bar{D} \cdot t}{l^2}} \quad (1)$$

式中 M_t 与 M_∞ 分别为时间 t 和无限长时溶质吸附量， $\bar{D}$ 为有效扩散系数， l 为膜的厚度。

4.1.3 关于溶质与树脂填充纤维吸附剂之间传质过程的一些考虑

从第三章可知，树脂均匀地分布在纤维基体中构成了树脂填充纤维吸附剂。以树脂填充纤维吸附剂为介质的纤维色谱传质过程与颗粒填充色谱及膜色谱相比是有差别的，它包含两个过程，即溶质从本体溶液传递到分布在纤维基体内颗粒

表面的传质过程以及在颗粒孔隙内的传质过程。因此，树脂填充纤维吸附剂的传质过程更为复杂，其传质阻力也相对较大。

具体来讲，溶质在树脂填充纤维吸附剂中的吸附过程包括以下几个步骤：（1）溶质从本体溶液扩散到多孔纤维基体表面的膜扩散过程；（2）溶质从纤维基体孔隙扩散至树脂颗粒表面或基体内壁吸附点的孔扩散过程；（3）溶质从树脂表面扩散到树脂孔隙的膜扩散过程；（4）溶质从树脂孔隙扩散到孔隙内壁的孔扩散过程；（5）溶质与吸附点的结合，并形成了溶质-吸附剂复合物。

依照上述的传质机理，颗粒填充纤维吸附剂的传质阻力可用下式描述：

$$1/K = 1/K_{膜} + 1/K_{孔} + 1/K_{颗粒} + 1/K_{反应} \quad (2)$$

$$1/K_{颗粒} = 1/K'_{膜} + 1/K'_{孔} + 1/K'_{反应} \quad (3)$$

式中 K 是总的传质系数， $K_{膜}$ 是溶质在纤维表面的膜扩散传质系数， $K_{孔}$ 是溶质在纤维基体孔隙内的传质系数， $K_{颗粒}$ 是溶质与颗粒之间相互作用的传质系数， $K_{反应}$ 是溶质与纤维基质的非特异吸附点之间相互作用的传质系数； $K'_{膜}$ 是溶质在颗粒表面的膜扩散传质系数， $K'_{孔}$ 是溶质在颗粒孔隙内的传质系数， $K'_{反应}$ 是溶质与颗粒吸附点之间相互作用的传质系数。其中， $K_{孔}$ 是与吸附剂结构因素相关的传质系数，例如，孔的尺寸、孔径分布、孔隙率、孔的弯曲度、吸附剂亲水性、吸附剂的形态结构、吸附剂表面电势能等。

在式（2）中，影响溶质传质阻力的主要因素是纤维基体与颗粒中的孔扩散，其中，纤维基体中的孔扩散可以通过调整吸附剂形态结构使溶质传质阻力减少。为此，在第三章我们提出了理想吸附剂的结构特点，并制备了表面具有开孔结构的树脂填充多孔性 PES 纤维吸附剂。

4.2 实验部分

4.2.1 原材料

基质材料：聚醚砜（PES）：型号 Ultrason[®]E6020P, $M_w \approx 50000$ ，由 BASF 制造。

功能性微粒：Lewatit 阳离子交换树脂（CER）：型号：CNP80ws（弱酸阳离子交换树脂）及 SP112ws（强酸型大孔阳离子交换树脂），树脂粉末平均粒径约 10 微米，Bayer 公司提供。

添加剂及其它溶剂：聚乙二醇 400（PEG400）（合成级）、二乙二醇单乙醚（DEGMEE）（合成级）、三缩四乙二醇（TEEG）（合成级）、丙酮（AR），Merck 公司提供。

溶剂：N-甲基吡咯烷酮：纯度 99%，购自 Acros Organics 公司。

蛋白质模型物：牛血清蛋白（BSA）：Fraction V，Sigma 提供。

新鲜的缓冲溶液用超纯水配制，超纯水用 Millipore 公司 Milli-Q plus 纯水机制造，其电导率为 18MΩ.CM。

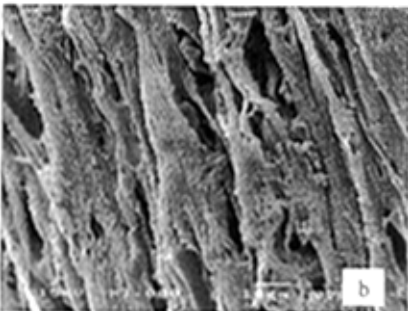
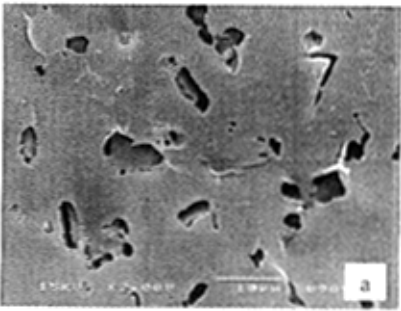
以上所有物品未经进一步纯化直接使用。

4.2.2 树脂填充纤维吸附剂的制备

纤维吸附剂的制备同第三章。本实验所用纤维吸附剂的性能见表 4.2.1、图 4.2.1、图 4.2.2 及图 4.2.3。

表 4.2.1 树脂填充纤维吸附剂的性能

聚合物 基质	树脂		纤维形状与尺寸		结构类型	
	种类	填充量 /%	形状	直径 /mm	表皮 致密	表皮开孔
PES	CNP80ws	10~85	实心	0.5~0.6	airgap	DEGMEE,
	SP112ws	50	纤维	0.5~0.6		丙酮, TEEG



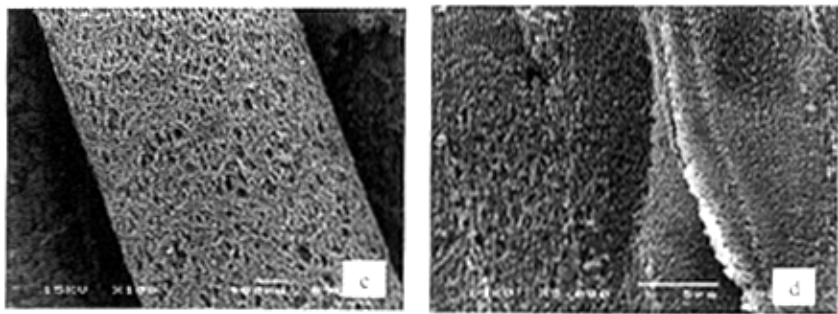


图 4.2.1 树脂 CNP80ws 填充纤维吸附剂的表面 SEM 照片(树脂填充量 50%):
a-airgap; b-DEGMEE; c-丙酮; d-TEEG

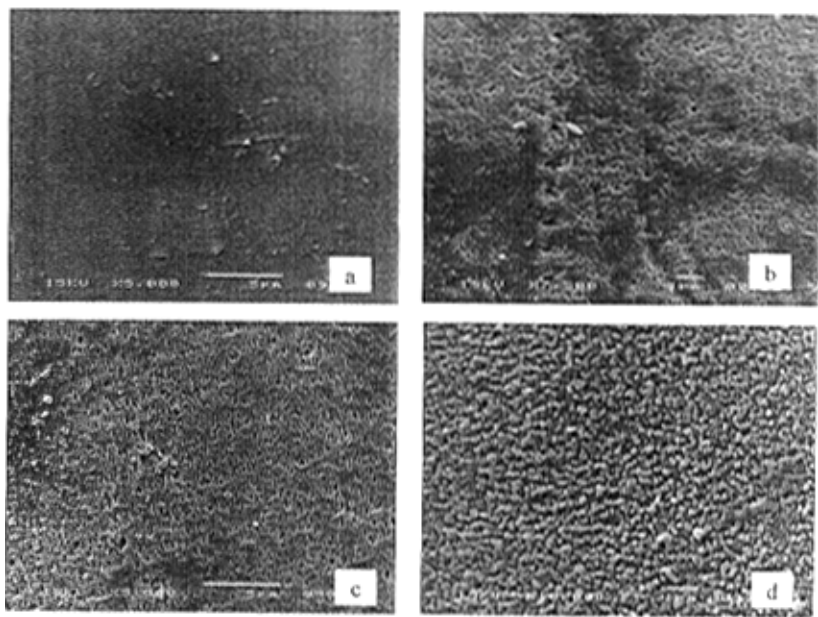
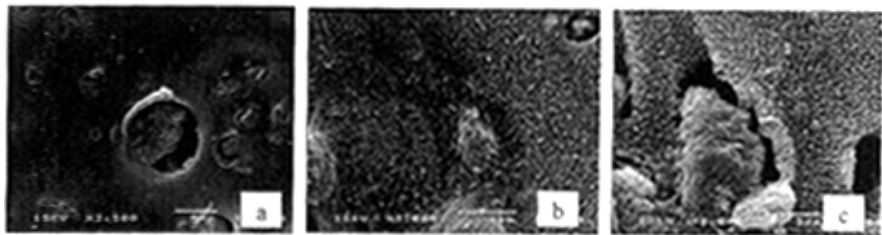


图 4.2.2 无树脂填充 PES 纤维的表面 SEM 照片
a-airgap; b-DEGMEE; c-丙酮; d-TEEG



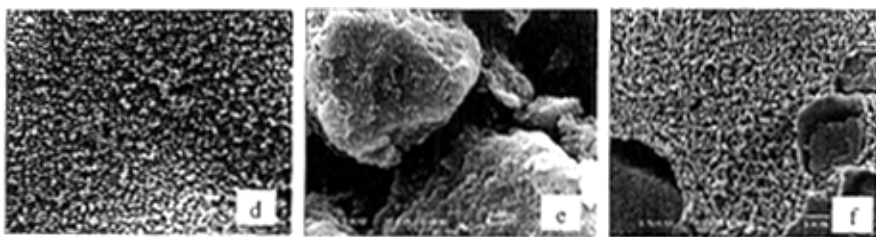


图 4.2.3 纯树脂 SP112ws 及其填充纤维吸附剂的 SEM 照片(树脂填充量 50%): 表面: a-airgap; b-DEGMEE; c-丙酮; d-TEEG; e-纯树脂 SP112w。横断面: f- air gap

4.2.3 纤维吸附剂的表征

4.2.3.1 吸附剂形态结构

纤维吸附剂的形态结构可以用 SEM 观察。样品的制备与观察同第三章。

4.2.3.2 BSA 浓度的测定

BSA 浓度可在 280nm 波长下用 Philips PU 8720 UV/VIS 紫外可见光谱仪测定。

4.2.3.3 纤维吸附剂的蛋白质静态吸附容量

纤维吸附剂的蛋白质静态吸附容量可用牛血清蛋白的间歇实验确定。已知量的吸附剂样品在 BSA 缓冲溶液中浸泡平衡后, 测量 24 小时单位重量样品的牛血清蛋白吸附量。料液蛋白质的浓度为 1-2mg/ml, 此浓度接近商业分离过程中蛋白质的真实含量。

在吸附试验中缓冲溶液采用 pH4.5, 100mM 的醋酸缓冲液, 此 pH 低于蛋白质等电点, 使蛋白质 BSA 呈正电, 而纤维吸附剂带负电, 蛋白质被包裹纤维中的阳离子交换树脂吸附, 导致本体溶液中蛋白质浓度降低。通过测量牛血清蛋白浓度的变化计算纤维吸附剂对蛋白质的静态吸附量, 其单位为 mg BSA/(g 吸附剂)。

4.2.3.4 纤维吸附剂的蛋白质脱附

吸附蛋白后的纤维样品首先用 pH4.5, 100mM 的醋酸缓冲液快速冲洗 3 次, 然后浸入 pH 高于蛋白质等电点的洗脱剂中使蛋白脱附。此时蛋白质 BSA 净电荷变为负值, 由于电荷排斥作用使蛋白质从多孔纤维基体的吸附点上解离, 扩散进入本体溶液中。本实验采用 pH9.0 Tris-HCl 缓冲溶液作为洗脱剂, 洗脱步骤的 BSA 浓度也用上述的方法在 280nm 检测。

所有的吸附与脱附实验均在 20℃ 恒温水浴振荡机内完成的, 振动频率为 100 次/分钟。

4.2.3.5 朗格缪尔等温吸附曲线

将相同重量的纤维吸附剂浸入起始浓度不同的 BSA 溶液中至不同的平衡浓度, 通过测量纤维吸附剂的吸附量与蛋白质溶液中 BSA 平衡浓度, 即可得到纤维吸附剂的等温吸附曲线。假设此吸附符合朗格缪尔等温吸附曲线, 其表达式为方程 (4) [7]。

$$\frac{1}{q^*} = \frac{1}{q_m} + \frac{K_d}{q_m} \times \frac{1}{C^*} \quad (4)$$

式中 q^* 为吸附剂的吸附量, C^* 为本体溶液中蛋白质平衡浓度。用 $1/q^*$ 对 $1/C^*$ 做图的线性模拟可决定蛋白质的解离系数 (K_d) 和吸附剂的最大吸附容量 (q_m)。

4.2.3.6 有效扩散系数 ($\bar{D}$)

平板膜的有效扩散系数可根据 4.1.2.4 节中方程 (1) 进行估计。对于实心纤维, 其扩散系数可从 Fick 第二定律推导的方程 (5) 估计出来^[10], 其中假设条件与平板膜相同。

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{4}{\pi^{\frac{1}{2}}} \left(\frac{Dt}{r^2} \right)^{\frac{1}{2}} - \frac{Dt}{r^2} - \frac{1}{3\pi^{\frac{1}{2}}} \left(\frac{Dt}{r^2} \right)^{\frac{3}{2}} + \dots \quad (5)$$

式中 r 为纤维的半径, 其它参数含义同方程 (1)。由于孔径与孔隙率的限制造成扩散系数较低, 在初始阶段, 上式第二项与其它项对扩散系数贡献不大, 可以忽略。如果对时间平方根作图, 吸附曲线接近直线, 根据方程 (6) 可大致估计蛋白质的扩散系数:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{4}{\sqrt{\pi}} \cdot \sqrt{\frac{\bar{D} \cdot t}{r^2}} \quad (6)$$

4.3 结果与讨论

4.3.1 树脂填充纤维吸附剂的吸附容量与脱附率

本章采用牛血清蛋白为模型蛋白质, 蛋白质静态吸附容量表征吸附剂的吸附能力。图 4.3.1 表明不同结构类型树脂填充吸附剂的吸附性能是有差别的。从 SEM 照片可知, DEGMEE 型、丙酮型及 TEEG 型纤维吸附剂表面具有开孔结构, 这种

结构类型纤维吸附剂对 BSA 具有较快的吸附速度和较大吸附容量。图 4.3.2 表示当吸附剂与洗脱液接触时两种不同结构类型吸附剂的脱附性能, 结果表明, 表面具有开孔结构的纤维吸附剂也同样具有较高的脱附率。

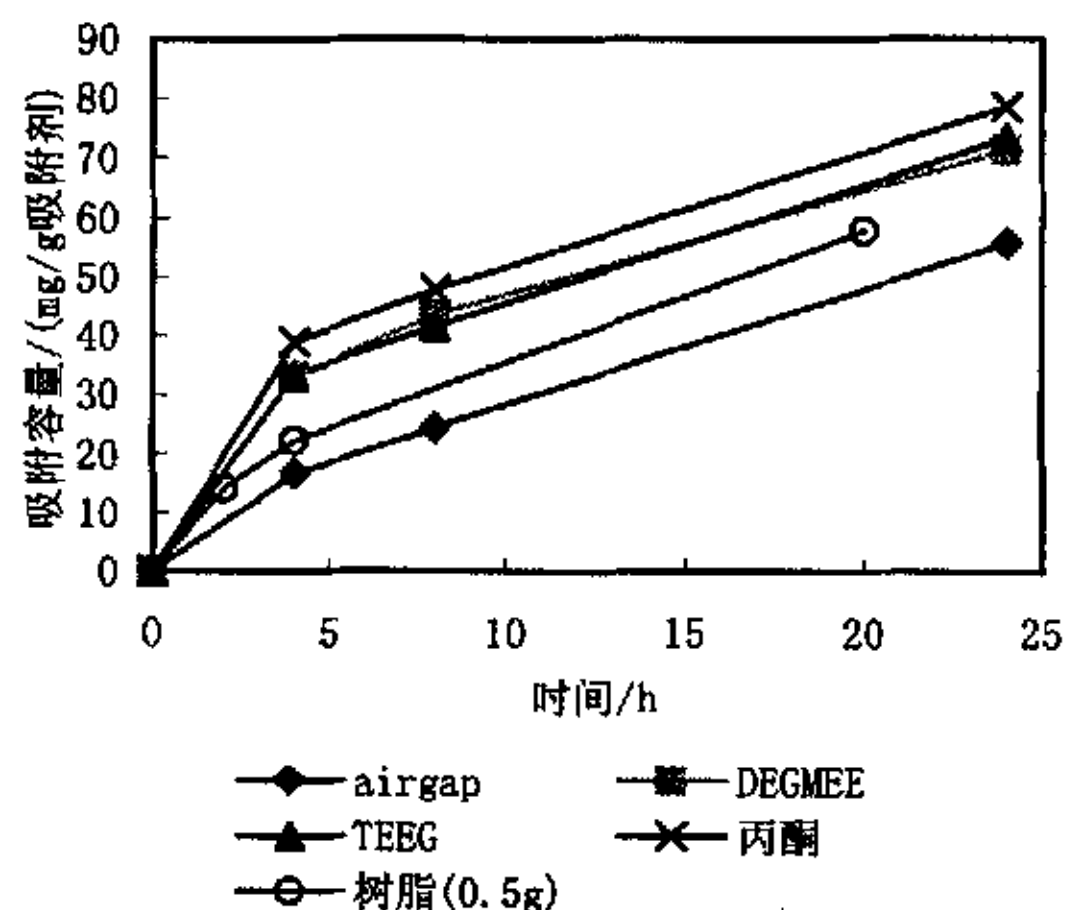


图 4.3.1 不同结构类型树脂填充纤维吸附剂的
吸附性能 (树脂 CNP80ws 填充量 50%)

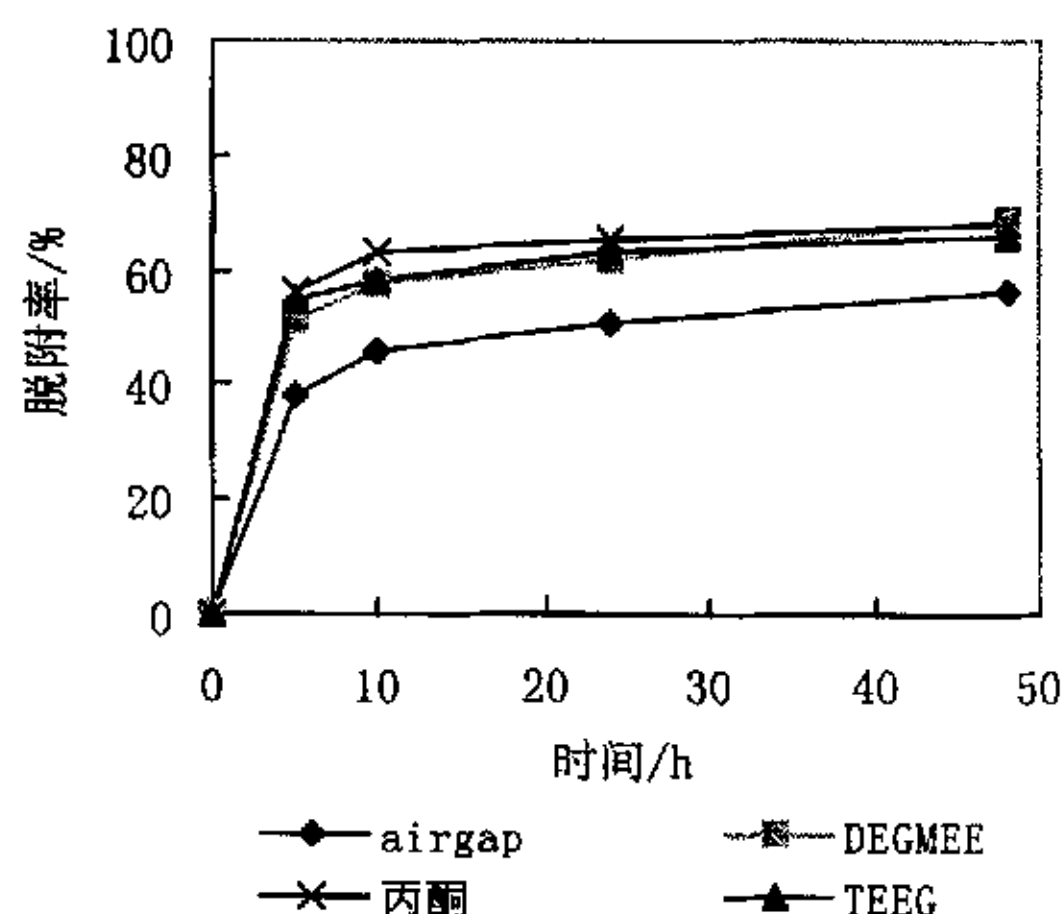


图 4.3.2 不同结构类型树脂填充纤维吸附剂
的脱附性能 (树脂 CNP80ws 填充量 50%)

树脂 SP112ws 填充纤维吸附剂与 BSA 的吸附与脱附性能如图 4.3.3 所示。尽管树脂 SP112ws 与树脂 CNP80ws 具有相近的吸附容量, 但树脂 SP112ws 填充纤维吸附剂对 BSA 具有更大的吸附容量 (图 4.3.3a、表 4.3.1)。图 4.2.3f 表明, 树脂 SP112ws 填充纤维吸附剂比树脂 CNP80ws 填充吸附剂具有更大的孔隙率及更多相互连通的孔, 这使树脂 SP112ws 填充纤维吸附剂中多孔 PES 纤维基体对 BSA 有更多的吸附。由于吸附在多孔 PES 纤维基体上的 BSA 难以解离, 所以树脂 SP112ws 填充纤维吸附剂具有较低的脱附率 (见图 4.3.3b 和表 4.3.1)。

表 4.3.1 树脂填充纤维吸附剂的吸附与脱附性能 (树脂填充量 50%)

类型	吸附容量/(mg BSA/g 吸附剂)		脱附率/%	
	CER(CNP80ws)/ PES	CER(SP112ws)/ PES	CER(CNP80ws)/ PES	CER(SP112ws)/ PES
无	53.5	68.4	56.5	51.2
DEGMEE	68.2	87.7	65.8	48.6
丙酮	78.5	91.7	65.5	55.1
TEEG	75.3	93.2	63.3	48.3

注: 纯树脂吸附容量(mg BSA/g 树脂): 117(树脂 CNP80ws); 122(树脂 SP112ws)

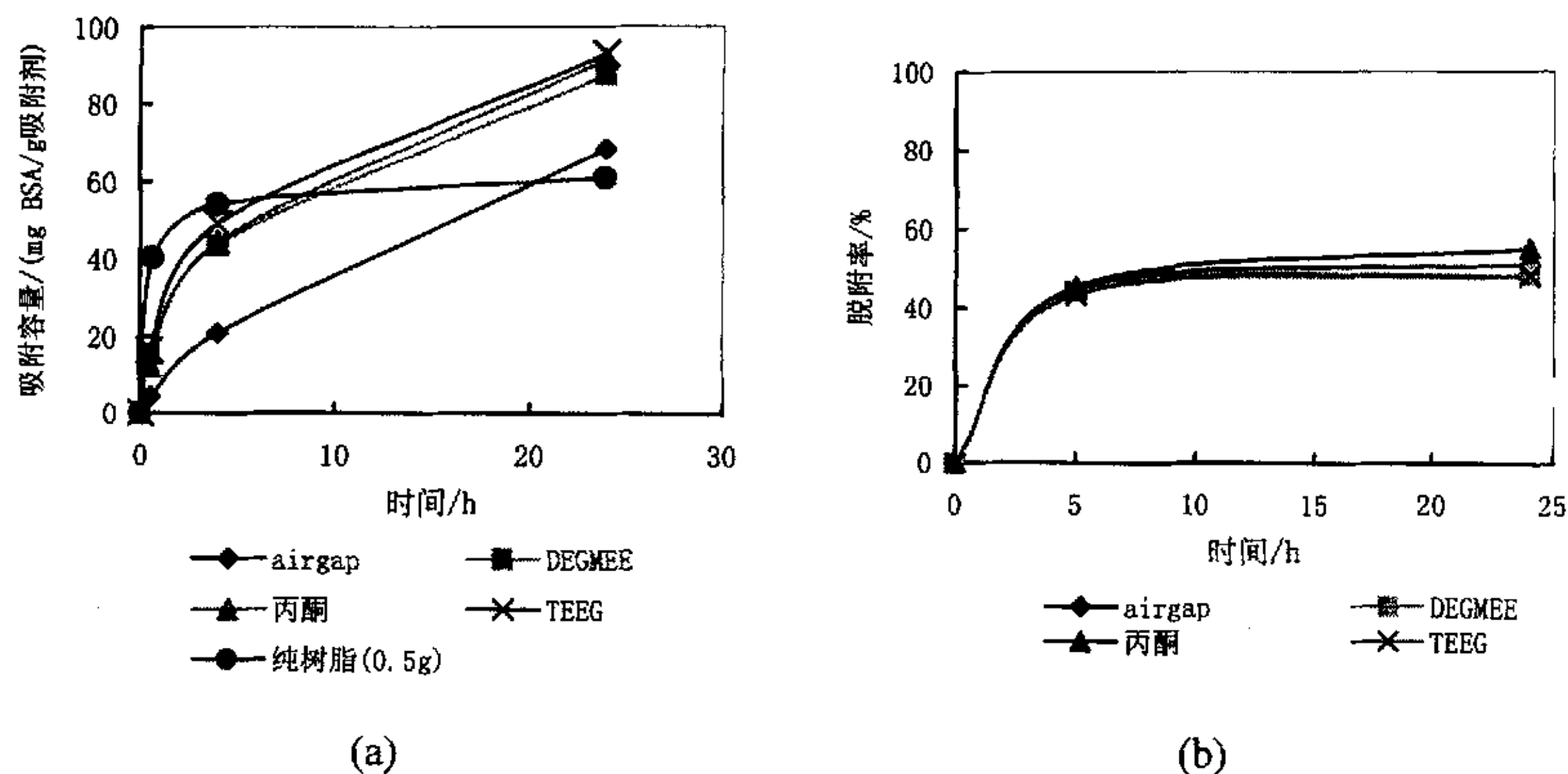


图 4.3.3 树脂 SP112ws 填充 PES 纤维吸附剂的吸附与脱附性能 (树脂填充量 50%)

a: 吸附与时间关系曲线; b: 脱附与时间关系曲线

吸附剂的纤维基体应满足以下要求: 孔隙率高、蛋白吸附量低、提供足够的通道供蛋白质自由传输、防止基体内任何树脂的泄漏。不同结构类型的无树脂填充 PES 纤维的吸附容量如图 4.3.4 所示。表皮致密的纤维基体对蛋白质 BSA 的吸附量非常低, 吸附主要发生在纤维表皮。令我们感兴趣的是, 表皮具有开孔结构的 PES 纤维基体具有较高的蛋白质吸附容量, 说明这种表面结构的纤维基体可以允许蛋白质自由进入基体多孔网络内, 并提供了更多的非特异性吸附点和传输通道。

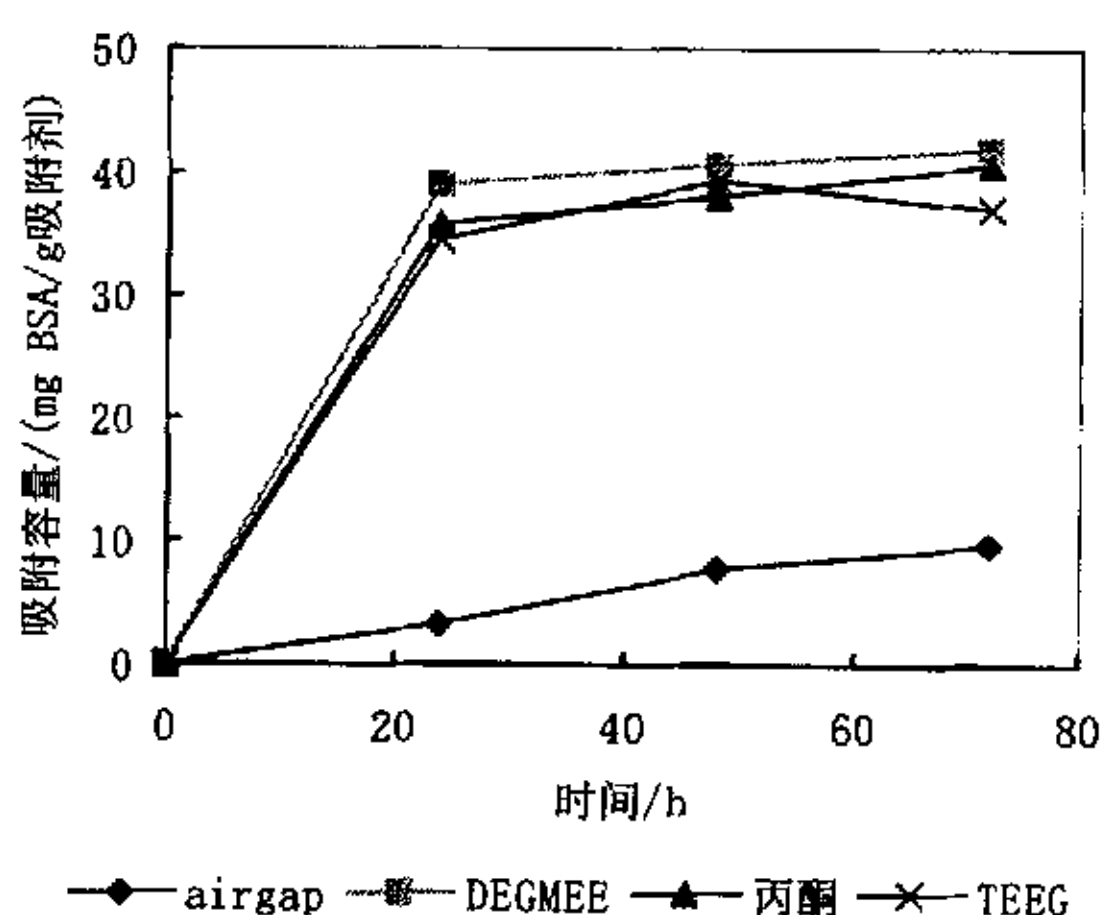


图 4.3.4 不同形态结构无树脂填充 PES 纤维吸附剂的吸附性能

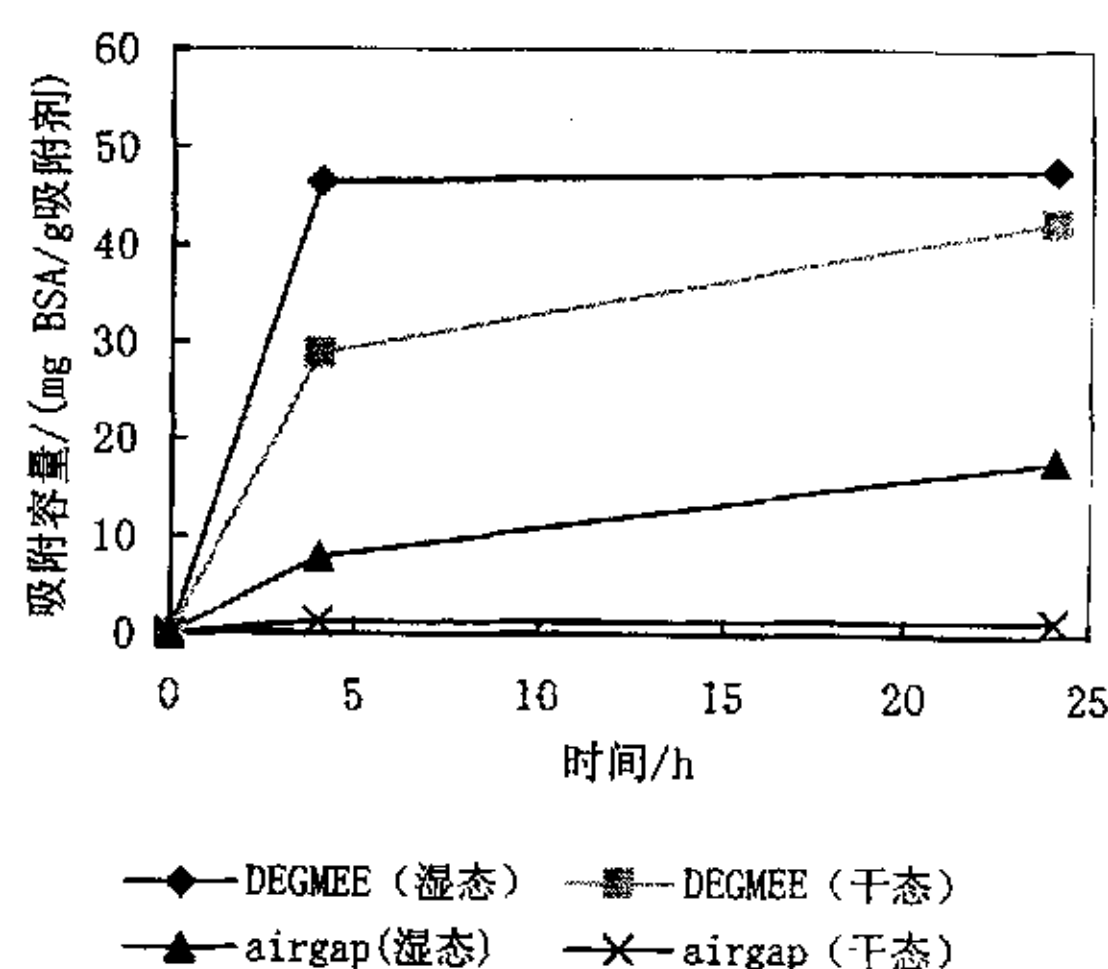


图 4.3.5 无树脂填充 PES 纤维的状态对吸附性能的影响

图 4.3.5 和图 4.3.7 表明, 无树脂填充 PES 纤维的状态对蛋白质的吸附与脱附也有影响。与干态纤维相比, 湿态纤维蛋白吸附容量更大, 这可能是干燥后纤维的孔隙率与孔径减小的缘故。图 4.3.6 及图 4.3.7 表明, 吸附在多孔的 PES 纤维基体内蛋白质难以完全脱附, 但表皮致密的纤维, 其脱附率超过 90%, 这可能是吸附点主要集中在纤维光滑表面的缘故。

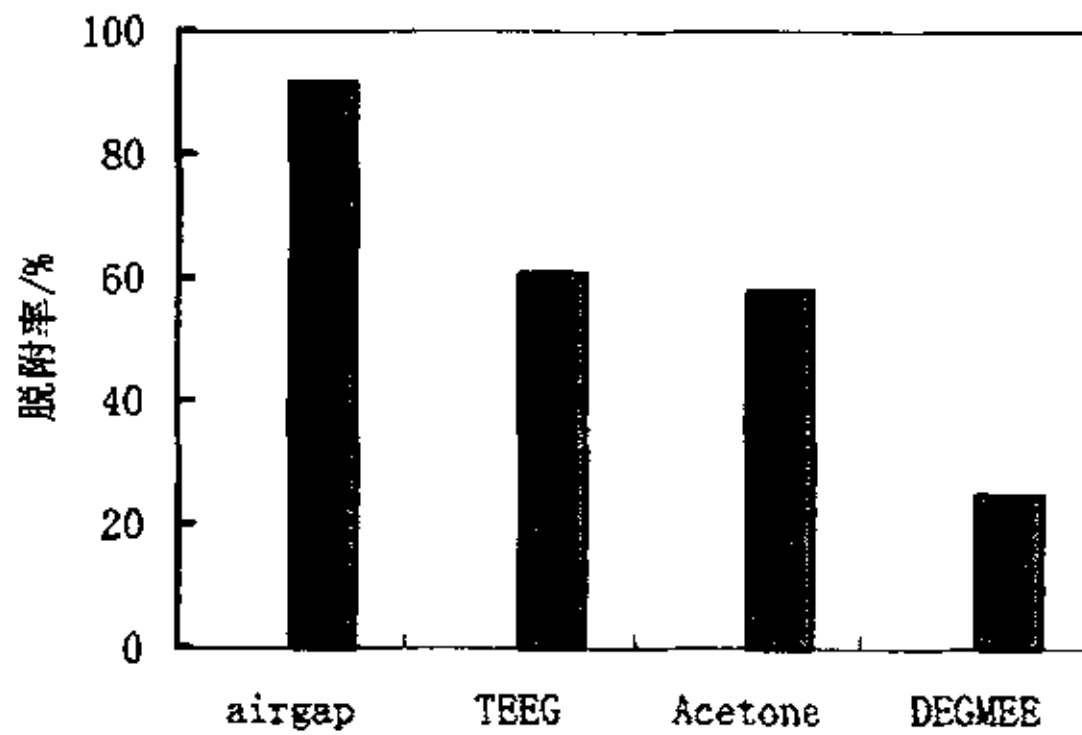


图 4.3.6 不同形态结构无树脂填充 PES

纤维吸附剂的脱附性能

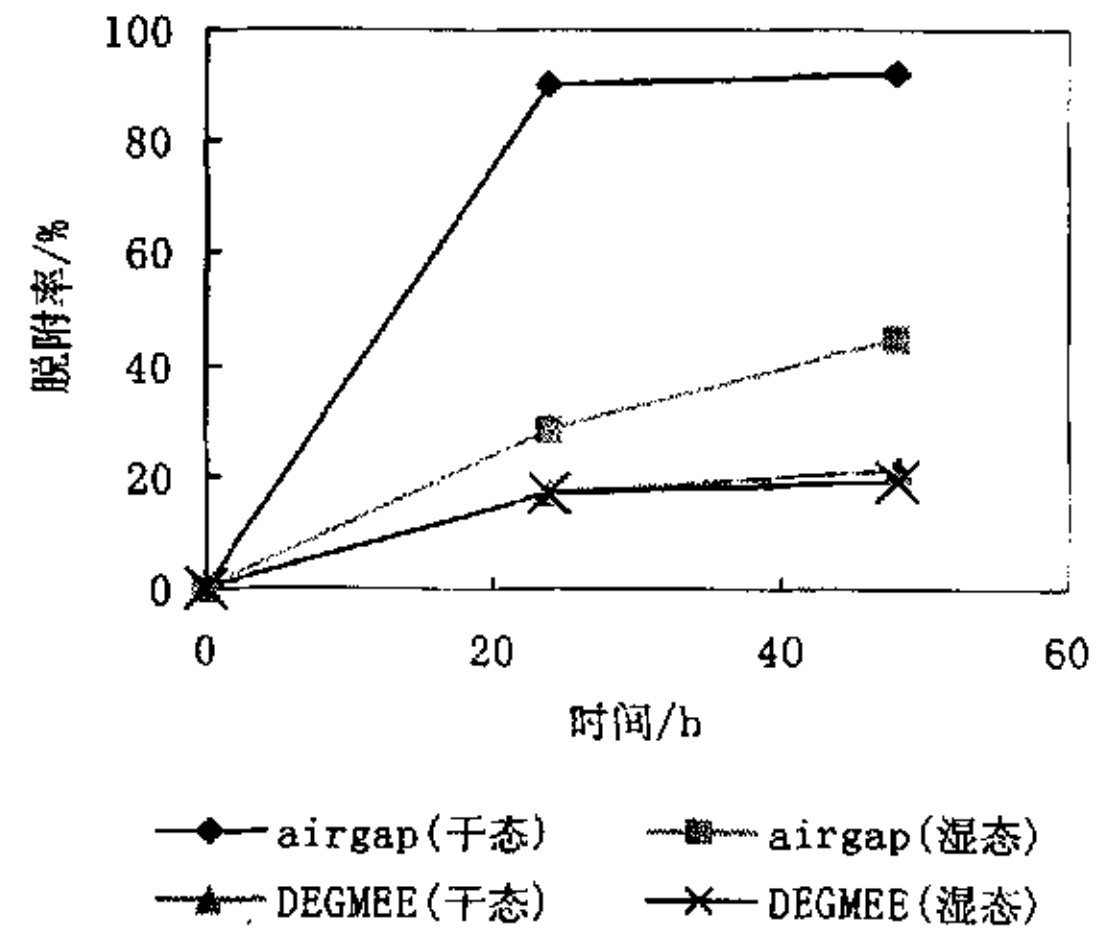


图 4.3.7 无树脂填充 PES 纤维状态对脱附

性能的影响

无树脂填充 PES 纤维再生对其吸附性能影响见图 4.3.8, 再生后各类纤维的吸附容量没有大的差别, 表面具有开孔结构的纤维吸附容量明显下降, 这可能是未解离的蛋白质占据了部分纤维基体内的吸附点。这表明吸附在 PES 纤维基体上的 BSA 较为稳定而难以彻底清除。

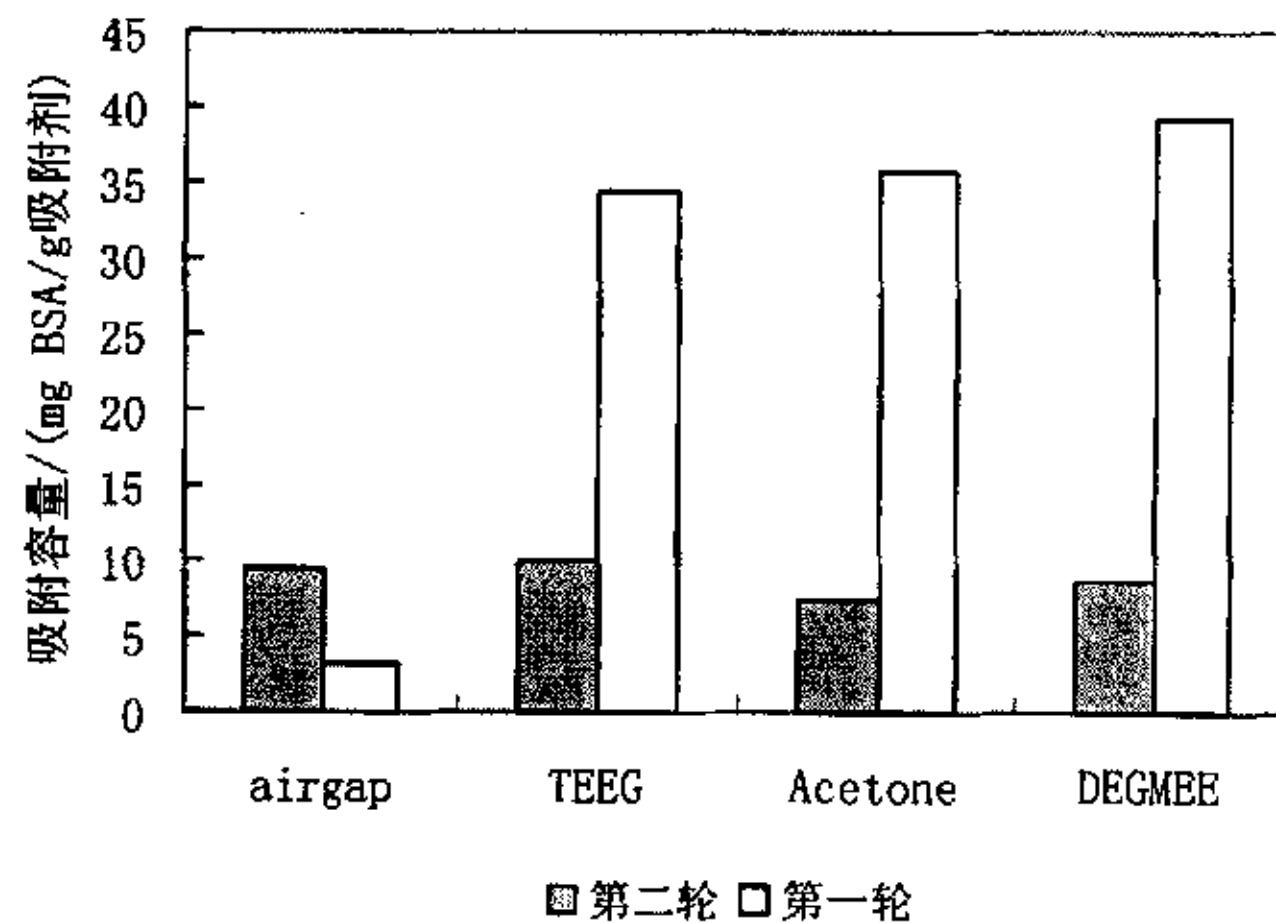


图 4.3.8 无树脂填充 PES 纤维再生对吸附性能的影响

与纯离子交换树脂以及纯 PES 纤维基体对蛋白质吸附相比,发现吸附在树脂填充纤维吸附剂上的大部分蛋白质是被吸附剂内填充树脂吸附(表 4.3.2)。对于表皮具有开孔结构的吸附剂,大部分填充树脂可自由吸附蛋白质;而对于表皮致密的吸附剂,由于部分树脂被聚合物包裹使之难以与蛋白质接触,这部分树脂失去了对蛋白质的吸附功能。此外,由于蛋白质难以从 PES 纤维基体吸附点上完全分离,所以吸附在聚合物上的蛋白质将减少纤维吸附剂总的脱附率。PES 基体、纤维吸附剂及纯树脂的吸附容量列于表 4.3.2。

表 4.3.2 PES、树脂与纤维吸附剂对 BSA 的吸附容量

类型	吸附容量/(mg BSA/g 吸附剂)			树脂(CNP80ws)
	PES 纤维基体	纤维吸附剂		
		表观	校正*	
airgap	9.7	53.5	43.5	116.8
DEGMEE	39.1	68.2	48.7	
丙酮	35.7	78.5	60.6	
TEEG	34.6	75.3	58	

* 1) 校正后的吸附容量等于吸附剂的表观吸附容量减去纯聚合物纤维基体的吸附容量; 2) CER CNP80ws 的填充量是 50%;

总之,具有开孔结构的树脂填充纤维吸附剂较之表皮致密的吸附剂具有更好的吸附性,蛋白质更容易从这种结构吸附剂中脱附。这表明蛋白质分子在表皮具有开孔结构吸附剂内的传质阻力较小。

4.3.2 影响纤维吸附剂吸附与脱附性能的一些因素

4.3.2.1 纤维吸附剂中树脂填充量的影响

如图 4.3.9(a)所示,树脂填充量高的纤维对蛋白质 BSA 有较高的吸附容量。图 4.3.9(b)表明,BSA 的脱附率同样也随纤维吸附剂中树脂填充量的增加而变大,说明吸附在离子交换树脂上的 BSA 容易解离且不易变性。

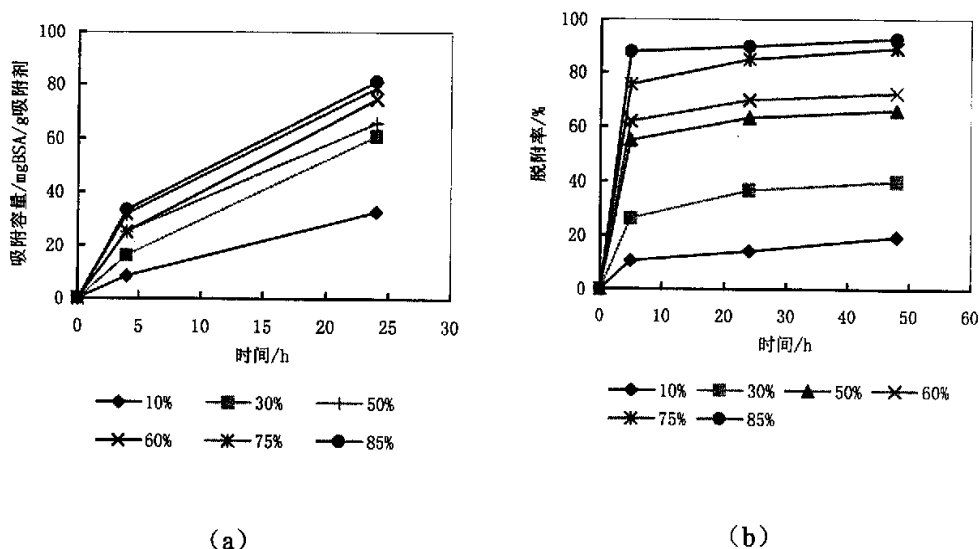


图 4.3.9 不同树脂 CNP80ws 填充量的纤维吸附剂 (airgap 类) 的吸附与脱附性能
a: 吸附与时间关系曲线; b: 脱附与时间关系曲线

4.3.2.2 纤维吸附剂直径与长度的影响

纤维直径对纤维吸附剂的吸附与脱附的影响如图 4.3.10 和图 4.3.11 所示, 纤维吸附剂的吸附容量和脱附率随直径变小而增加, 这与方程式 (6) 所表达的是一致的。由传质机理可知, 扩散速率随扩散距离的延长而降低, 而扩散距离与纤维直径成反比, 因此, 随纤维直径变小纤维吸附剂的吸附与脱附速率增大。另外, 由于纤维越细其比表面积越大, 所以这也有利于吸附。SEM 结果表明, 不同直径吸附剂之间的纤维基体及其表面形态结构没有明显的区别。因此, 在保持纤维的足够机械强度条件下应尽量缩小纤维吸附剂的直径。

图 4.3.12 表明, 纤维长度对蛋白质的吸附性能几乎没有影响。从图 4.3.13 可知, 在轴向纤维吸附剂孔隙之间不是完全连通的, 蛋白从纤维两端进入吸附剂内的可能性较小。因此, 只要纤维长度大于其直径, 长度对纤维吸附剂的吸附性能影响就不明显。

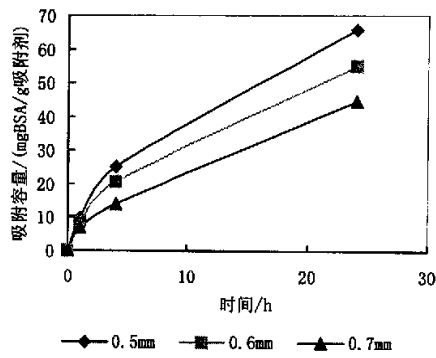


图 4.3.10 纤维直径对吸附性能的影响
(airgap 类, 树脂 CNP80ws 填充量 50%)

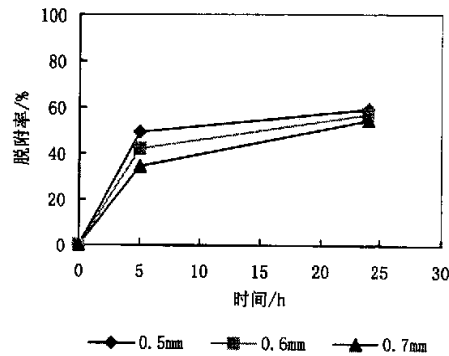


图 4.3.11 纤维直径对脱附性能的影响
(airgap 类, 树脂 CNP80ws 填充量 50%)

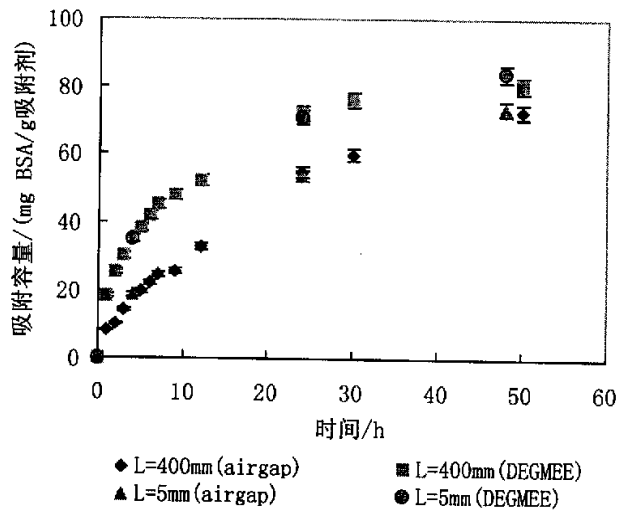


图 4.3.12 纤维长度对纤维吸附性能的影响 (树脂 CNP80ws 填充量 50%)

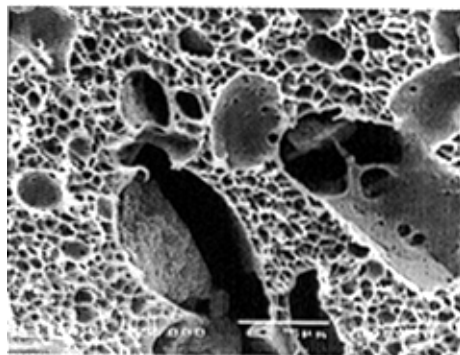


图 4.3.13 纤维吸附剂的横断面形态结构 (airgap 类, 树脂 CNP80ws 填充量 50%)

4.3.2.3 纤维吸附剂状态的影响

纤维吸附剂的状态对其吸附与脱附性能的影响如图 4.3.14~4.3.17 所示。湿态纤维的吸附容量较高,纤维吸附剂的脱附性能在湿态与再润湿态之间无太大差异。然而,干态下蛋白质的脱附率高于其他状态,特别是当纤维的表面结构较为致密时更为明显。在干态纤维吸附剂的吸附过程中,蛋白质 BSA 的吸附与纤维吸附剂的再润湿过程是同时进行的,BSA 主要与树脂发生吸附作用,而纤维基体对 BSA 的吸附量减少,导致干态纤维吸附剂的脱附率提高。

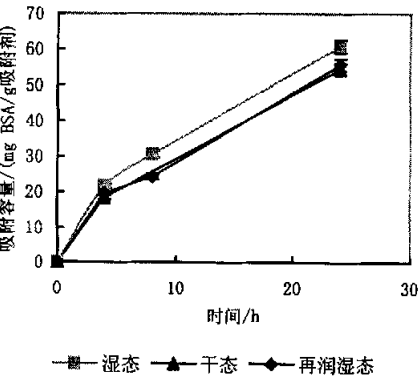


图 4.3.14 airgap 类纤维吸附剂的状态对吸附性能的影响 (树脂 CNP80ws 填充量 50%)

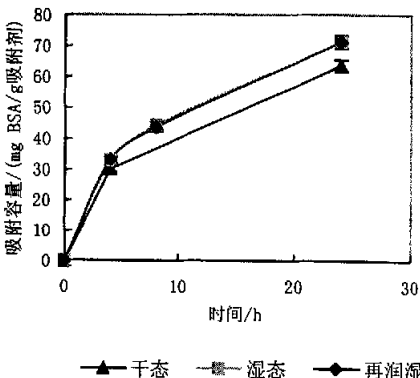


图 4.3.15 DEGMEE 类纤维吸附剂的状态对吸附性能的影响 (树脂 CNP80ws 填充量 50%)

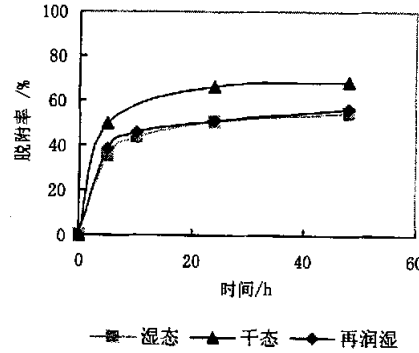


图 4.3.16 airgap 类纤维吸附剂的状态对脱附性能的影响 (树脂 CNP80ws 填充量 50%)

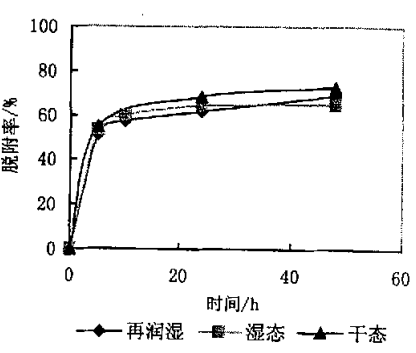


图 4.3.17 DEGMEE 类纤维吸附剂的状态对脱附性能的影响 (树脂 CNP80ws 填充量 50%)

4.3.2.4 蛋白质的变性

蛋白质变性是指在某些因素影响下如加热、特殊化学处理、极端 pH 等,蛋

白质的二、三级结构遭到破坏,使蛋白质失去了活性。如图 4.3.18 所示,纤维吸附剂的吸附时间对蛋白质脱附有明显的影响。蛋白质的脱附率随吸附时间延长而急剧下降,表明在吸附过程中蛋白质变性的趋向随吸附时间的延长而增加。虽然较长的吸附时间增加了纤维吸附剂对蛋白质的吸附量,但是由于随时间延长蛋白质脱附率减少,蛋白质的回收率并不一定提高。因此,在实际分离操作中,如果目标定为从下游过程中回收或分离某些溶质,为获得较高的回收率须选择合适的吸附时间;如果目的是去除料液中某些杂质而达到澄清或净化的目的,可以通过延长吸附时间提高吸附剂的吸附容量。

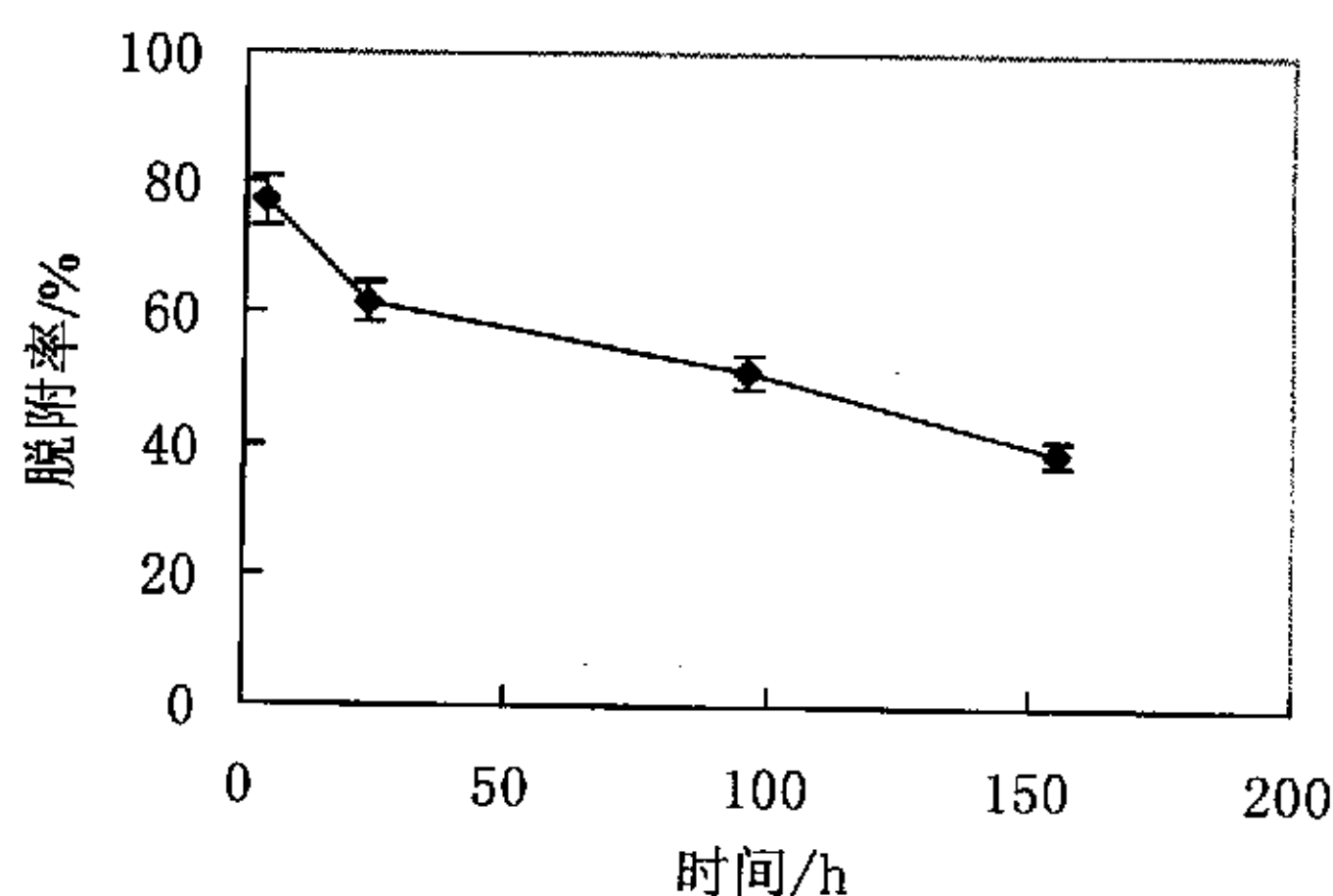


图 4.3.18 吸附时间对纤维吸附剂脱附性能的影响
(DEGMEE 类, 树脂 CNP80ws 填充量 50%)

4.3.3 纤维吸附剂的等温吸附曲线

当吸附过程处于平衡状态时,料液中 BSA 浓度与树脂填充纤维吸附剂吸附容量的关系如图 4.3.19 所示。当料液中 BSA 浓度较低时,吸附剂的吸附容量增加较快。图 4.3.20 表明,该等温吸附曲线符合朗格缪尔吸附模型。根据方程(4)计算的最大吸附容量 $q_{\max}$ 与蛋白质-吸附剂复合物的解离系数 K_d 列于表 4.3.3,从该表可知,airgap 类型纤维吸附剂的 $q_{\max}$ 和 K_d 大于其它类型,表明表皮较为致密的纤维吸附剂在平衡状态下其吸附容量及蛋白质的解离性都较高。然而,由于吸附剂的致密表皮结构造成的吸附动力学限制,在较低的料液 BSA 浓度下,airgap 类型吸附剂的吸附容量和脱附率都低于其它类型的吸附剂。

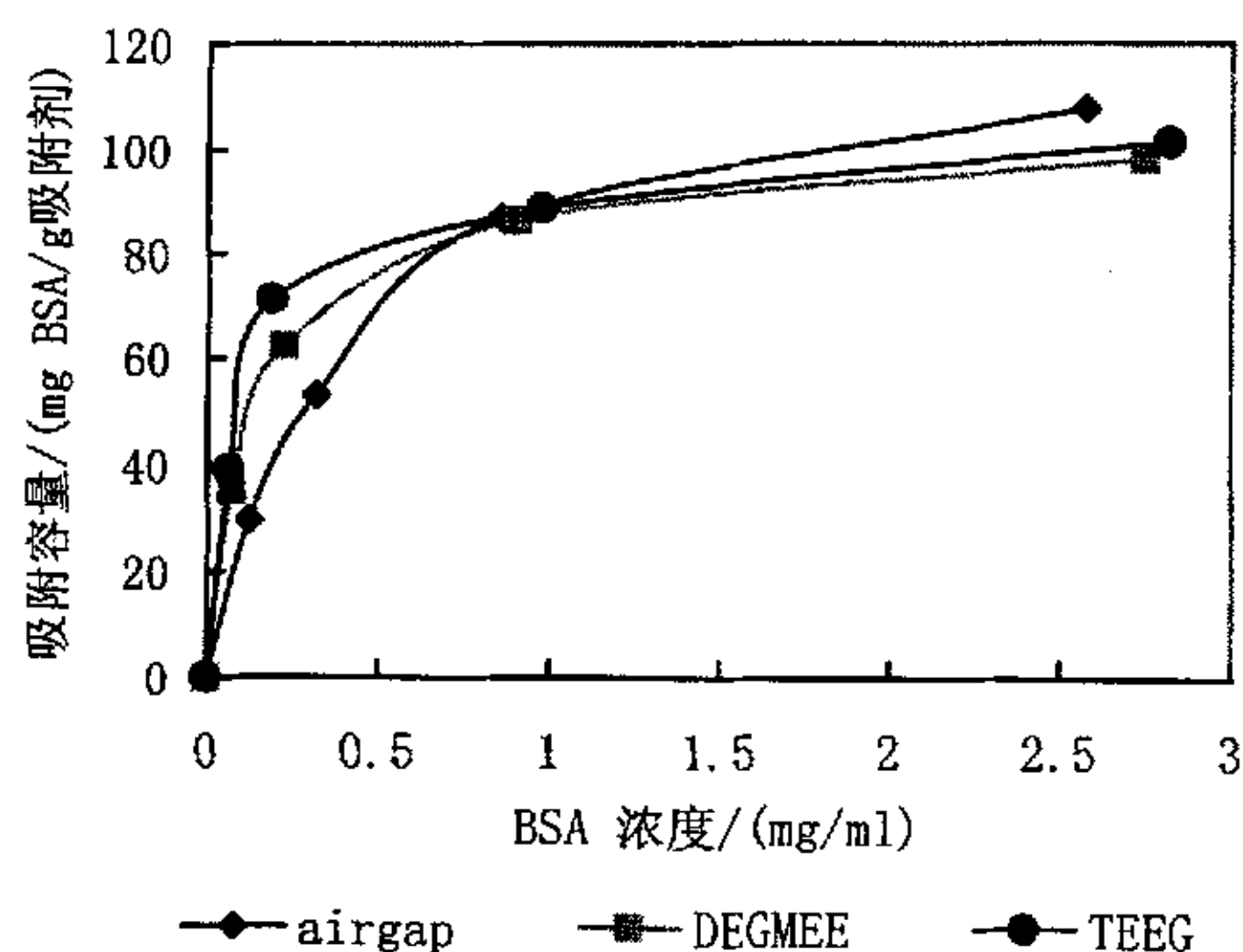


图 4.3.19 不同结构树脂填充纤维吸附剂与蛋白质 BSA 的平衡吸附曲线 (树脂 CNP80ws 填充量 50%)

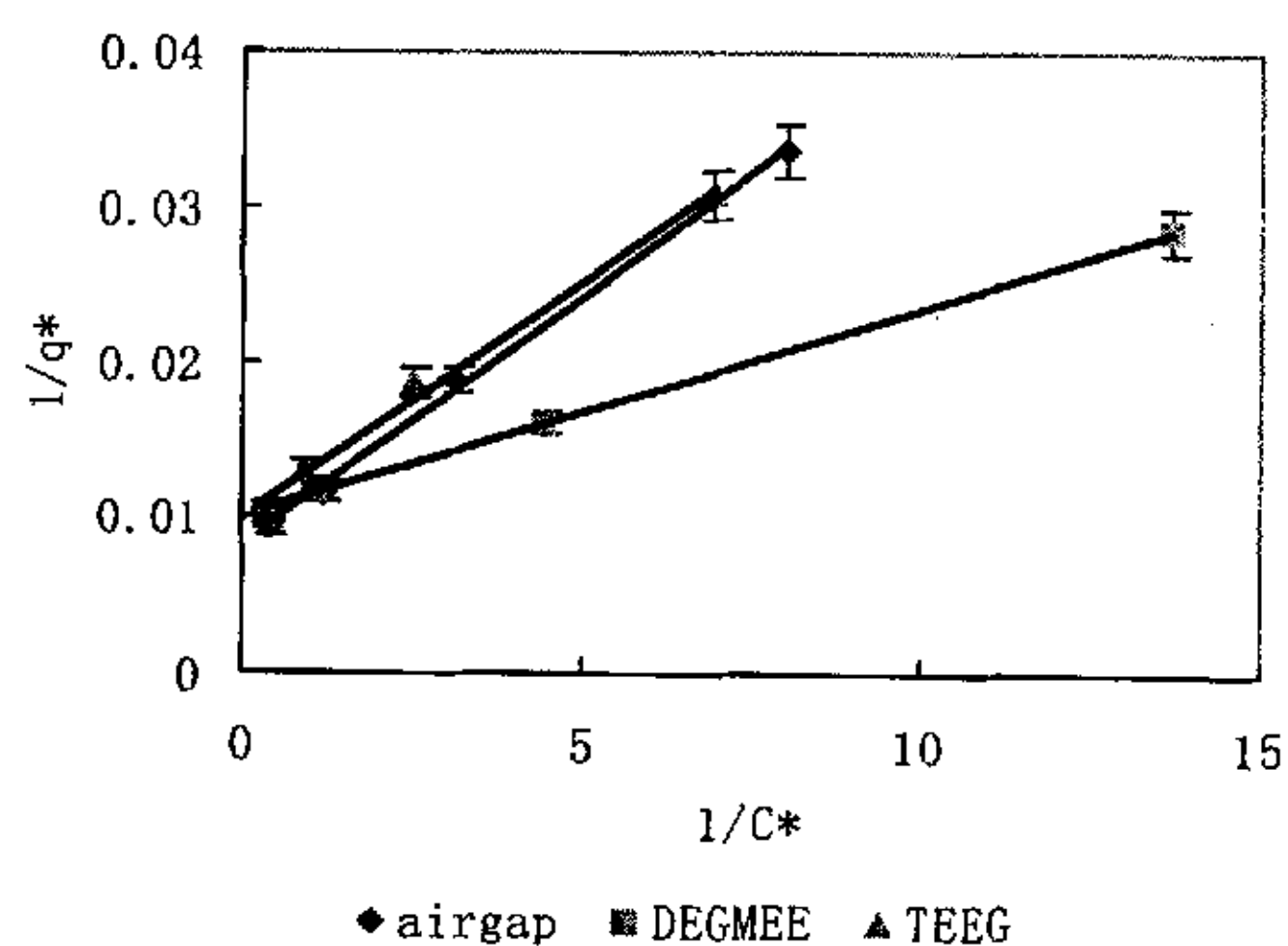


图 4.3.20 纤维吸附剂的朗格缪尔模型拟合曲线 (树脂 CNP80ws 填充量 50%)

表 4.3.3 不同类型纤维吸附剂的最大吸附容量 ($q_{\max}$) 与解离系数 (K_d)

类型	$q_{\max}/(\text{mg BSA/g 吸附剂})$	$K_d/(\text{mg/g})$
airgap	138.9	0.395
DEGMEE	101	0.141
TEEG	105.3	0.105

4.3.4 有效扩散系数

树脂填充纤维吸附剂的吸附容量与时间的关系如图 4.3.21 所示, 这种关系可用来描述蛋白质吸附动力学。依据本章 4.1.3 节提出的传质机理, 由于在初始阶段吸附主要发生在树脂表面以及多孔纤维基体内, 所以在初始阶段吸附剂的吸附容量增加较快, 在这个阶段控制步骤是蛋白质从本体扩散到树脂表面; 在中后期蛋白质从树脂表面扩散到树脂孔隙内的吸附点则是控制步骤。

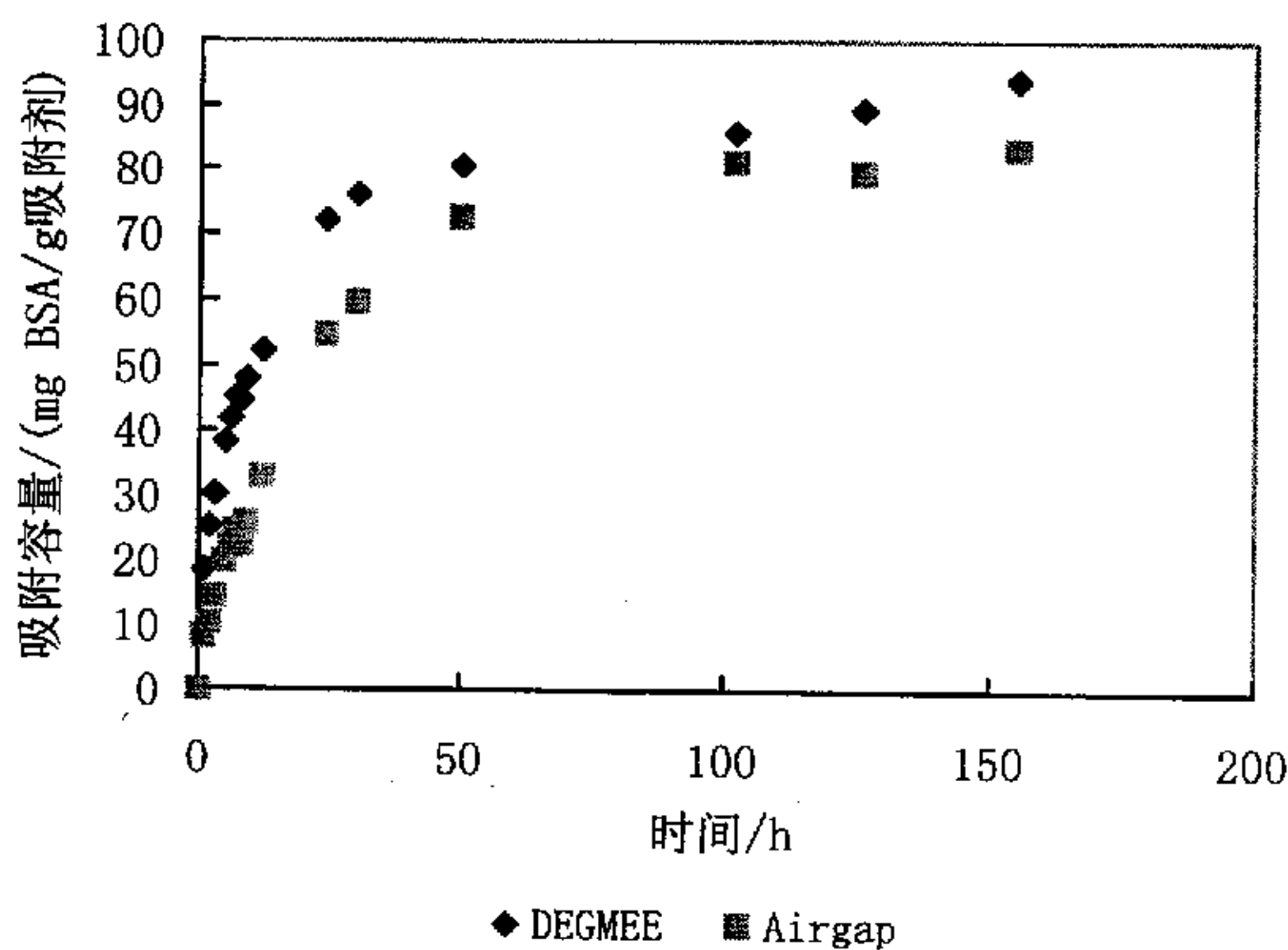


图 4.3.21 纤维吸附剂的吸附容量与时间关系曲线 (树脂 CNP80ws 填充量 50%)

与纯树脂相比, 可以发现表皮具有开孔结构的吸附剂对蛋白质 BSA 的吸附速度不低于纯树脂的吸附速度 (图 4.3.1), 说明蛋白质在吸附剂多孔基体内的扩散阻力较小, 由此可知, 蛋白质从树脂表面扩散到树脂内孔隙壁上的吸附点是控制步骤。然而, 对于表皮致密的纤维吸附剂, 蛋白质从本体扩散到包裹在吸附剂基体内树脂表面的吸附点以及蛋白质从树脂表面扩散到树脂内孔隙壁上的吸附点这两个过程是整个吸附过程的控制步骤。

图 4.3.22 是不同类型结构纤维吸附剂扩散动力学的模拟结果, 它们都较好地符合 Fick 第二定律, 表明树脂填充纤维吸附剂的吸附过程是由在吸附剂多孔基体内或树脂空隙内的扩散过程来控制的。依据扩散方程 (6) 可计算出不同情形下吸附剂的扩散系数, 如表 4.3.4 所示。与已报道的吸附剂相比, BSA 在纤维吸附剂内扩散系数具有一定的可比性。例如, BSA 在不同离子交换树脂内的扩散系数在 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ 范围内^[11-17], BSA 在树脂 CNP80ws 填充 EVAL 膜吸附剂中有效扩散系数约为 $3.4 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ ^[9]。与 BSA 在其溶液中的自由扩散系数 ($5.3 \sim 7$

$\times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) [7]相比, BSA 在树脂填充纤维吸附剂的有效扩散系数低 3 个数量级左右, 这可能是由于蛋白质在吸附剂多孔基体内或树脂空隙内扩散阻力所致。影响 BSA 扩散系数的因素较多, 例如, 吸附剂的结构因素(如孔径、孔隙率、孔的弯曲度、亲水性等)、树脂的特性(如离子交换容量、孔隙尺寸、孔隙率、离子基团大小等)、树脂填充量、甚至料液中 BSA 浓度等。

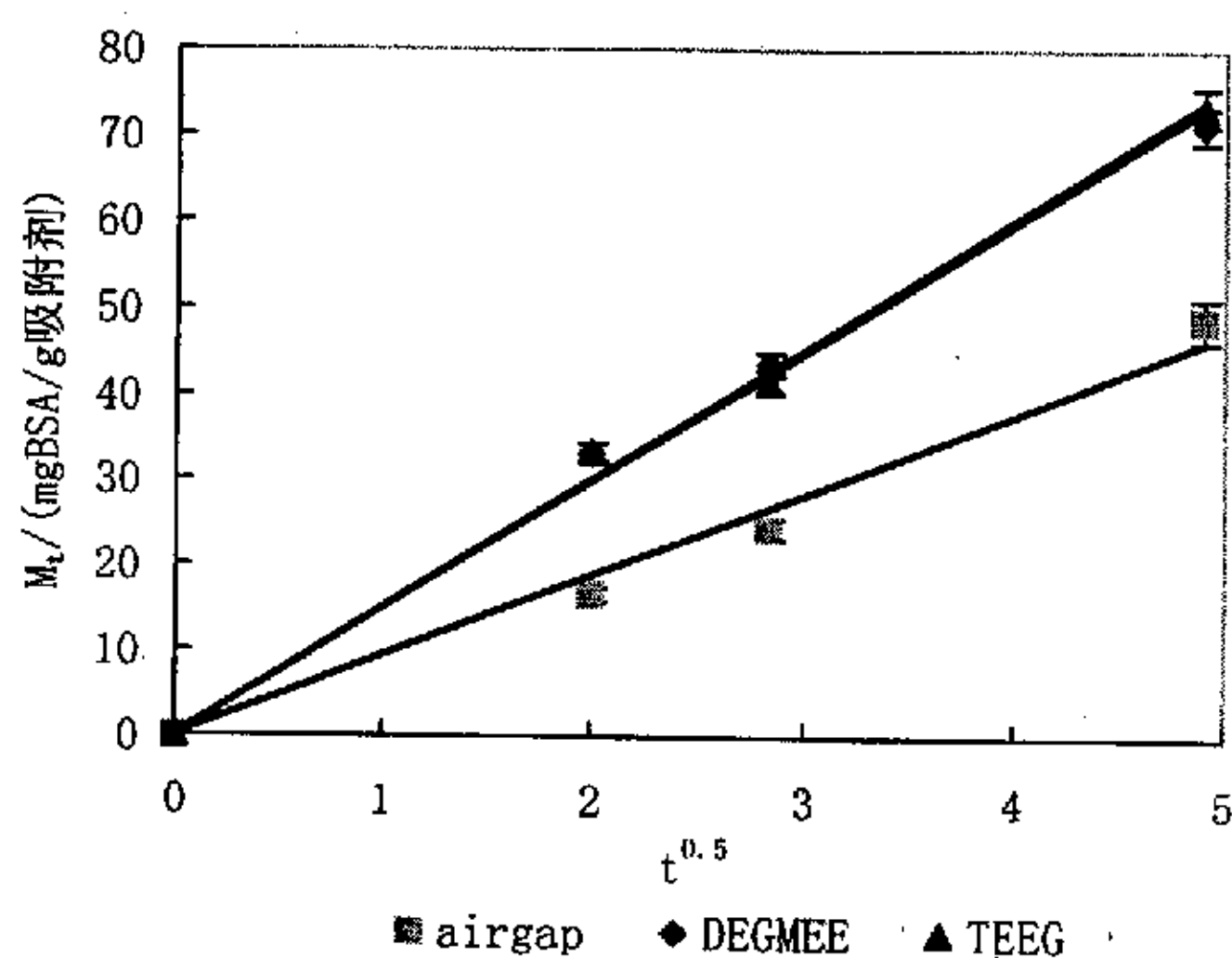


图 4.3.22 树脂填充纤维吸附剂的吸附容量与时间平方根的关系曲线

表 4.3.4 不同类型树脂填充 PES 纤维吸附剂中 BSA 的有效扩散系数 ($\bar{D}$)

类型	纤维状态	半径/(mm)	$q^*_{\max}/(\text{mg BSA/g 吸附剂})$	$\bar{D}/(\text{m}^2/\text{sec})$
airgap	dry	0.3	138.9	$1.82\text{E-}14$
DEGMEE	dry	0.27	101	$8.70\text{E-}14$
TEEG	dry	0.23	119	$4.62\text{E-}14$

注: 树脂 CNP80ws 填充量 50%

4.4 本章小结

(1) 表皮具有开孔结构的树脂填充纤维吸附剂具有较好的吸附与脱附性能, 其蛋白质吸附容量为 68.2~93.2 mg BSA/g 吸附剂(树脂填充量 50%), 使蛋白质传

质阻力大大降低。

(2) 与树脂 CNP80ws 相比, 树脂 SP112ws 填充纤维吸附剂对 BSA 具有较高的吸附容量, 但其脱附率较低。树脂填充量越高、纤维越细, 则纤维吸附剂的蛋白质吸附容量与脱附率就越大。另外, 干态树脂填充吸附剂对蛋白质吸附容量低, 但脱附率较高。随吸附时间的延长吸附剂的脱附率下降。

(3) 蛋白质 BSA 在树脂填充纤维吸附剂中的平衡吸附过程符合朗格缪尔吸附模型。树脂 CNP80ws 填充吸附剂的最大吸附容量为 100~139 mg BSA/g 吸附剂。表面具有开孔结构的树脂填充纤维吸附剂的吸附速率与纯树脂相当, BSA 在纤维吸附剂中的扩散系数为 $1.82 \times 10^{-14} \sim 8.7 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{sec}$ 。

(4) 对于蛋白质在树脂填充纤维吸附剂中的传质过程, 本文提出吸附剂基体内的孔扩散与树脂内的孔扩散是速率控制步骤, 随吸附剂形态结构不同二者对传质过程的影响也有差别。树脂填充纤维吸附剂传质机理还有待进一步深入研究。

4.5 参考文献

- 1) Elias Klein, Affinity membranes: a 10-year review J. Membrane Science 179 (2000) (1-27)
- 2) J. Thommes and M. R. Kula, Membrane Chromatography-An Integrative Concept in the Downstream Processing of Proteins Biotechnol. Prog. 1995, 11, 357-367
- 3) D. Keith Roper, Edwin N. Lightfoot, Separation of biomolecules using adsorptive membranes, J. Chromatography A, 702(1995) 3-26
- 4) Catherine Charcosset, Purification of Proteins by Membrane Chromatography, J. Chem. Technol. Biotechnol., 71 (1998), 95-110
- 5) Raja Ghosh, Protein separation using membrane chromatography: opportunities and challenges J. Chromatography A, 952 (2002) 13-27
- 6) P.W. Atkins, Physical Chemistry, 5th ed, Oxford University Press, Oxford, 1994
- 7) D.D. Do, Adsorption analysis: equilibria and kinetics, Imperial College Press, London, 1998
- 8) Ulber, R., Plate, K., Weiss, T., Demmer, W., Buchholz, H., Scheper, T.

- Downstream Processing of Bovine Lactoferrin from Sweet Whey, *Acta Biotechnol.* 21 (2001) 1, 27–34
- 9) M. Avramescu Membrane adsorbers development and applications PhD thesis, University of Twente (2002)
- 10) J. Crank, *The mathematics of diffusion*, Oxford Clarendon Press, 1979.
- 11) K. Miyabe, G. Guiochon Kinetic study of the mass transfer of bovine serum albumin in anion-exchange chromatography *J. Chromatography A*, 866(2000)147-171
- 12) A.M. Tsai, D. Englert, E.E. Graham, Study of the dynamic binding capacity of two anion exchangers using bovine serum albumin as a model protein, *J. Chromatography A*, 504 (1990) 89-95.
- 13) M.A. Fernandez, W.S. Laughinghouse, G. Carta, Characterization of protein adsorption by composite silica-polyacrylamide gel anion exchangers II. Mass transfer in packed columns and predictability of breakthrough behavior, *J. Chromatography A*, 746 (1996) 185-198.
- 14) R. Gutsche, H. Yoshida, Solid Diffusion in the pores of cellulose membrane, *Chem. Eng. Sci.*, 49 (1994) 179-188.
- 15) K. Miyabe, G. Guiochon, Kinetic Study of the Concentration Dependence of the Mass Transfer Rate Coefficient in Anion-Exchange Chromatography of Bovine Serum Albumin, *Biotechnol. Prog.*, 15 (1999) 740-752.
- 16) A.K. Hunter, G. Carta, Protein adsorption on novel acrylamido-based polymeric ion exchangers II. Adsorption rates and column behavior *J. Chromatography A*, 897 (2000) 81-97
- 17) M.A. Fernandez, G. Carta, Characterization of protein adsorption by composite silica-polyacrylamide gel anion exchangers I. Equilibrium and mass transfer in agitated contactors, *J. Chromatography A*, 746 (1996) 169-183

第五章 影响树脂填充纤维吸附剂吸附与脱附性能的操作因素

摘要

本章重点研究了影响树脂填充 PES 纤维吸附剂吸附与脱附性能的操作因素。考察了 BSA 溶液 pH、BSA 浓度、洗脱剂 pH 和离子强度、吸附剂预处理与后处理、吸附剂再生以及料液流动状态等因素对吸附剂吸附与脱附性能的影响。研究结果对蛋白质的实际分离具有重要的参考价值。

5.1 概述

我们知道,蛋白质是由氨基酸组成的,离子交换色谱是分离纯化蛋白质的有效方法之一。离子交换色谱分为颗粒填充床式色谱、膜色谱^[1-8]以及纤维色谱(见第三章)。蛋白质与离子交换类吸附剂之间的作用机理如图 1 所示^[9],它包括离子之间的静电相互作用、基团之间的氢键作用以及疏水作用。很多因素如蛋白质溶液的 pH 和离子强度、蛋白质浓度、蛋白质结构、等电点(pI)等均能影响蛋白质的吸附过程。

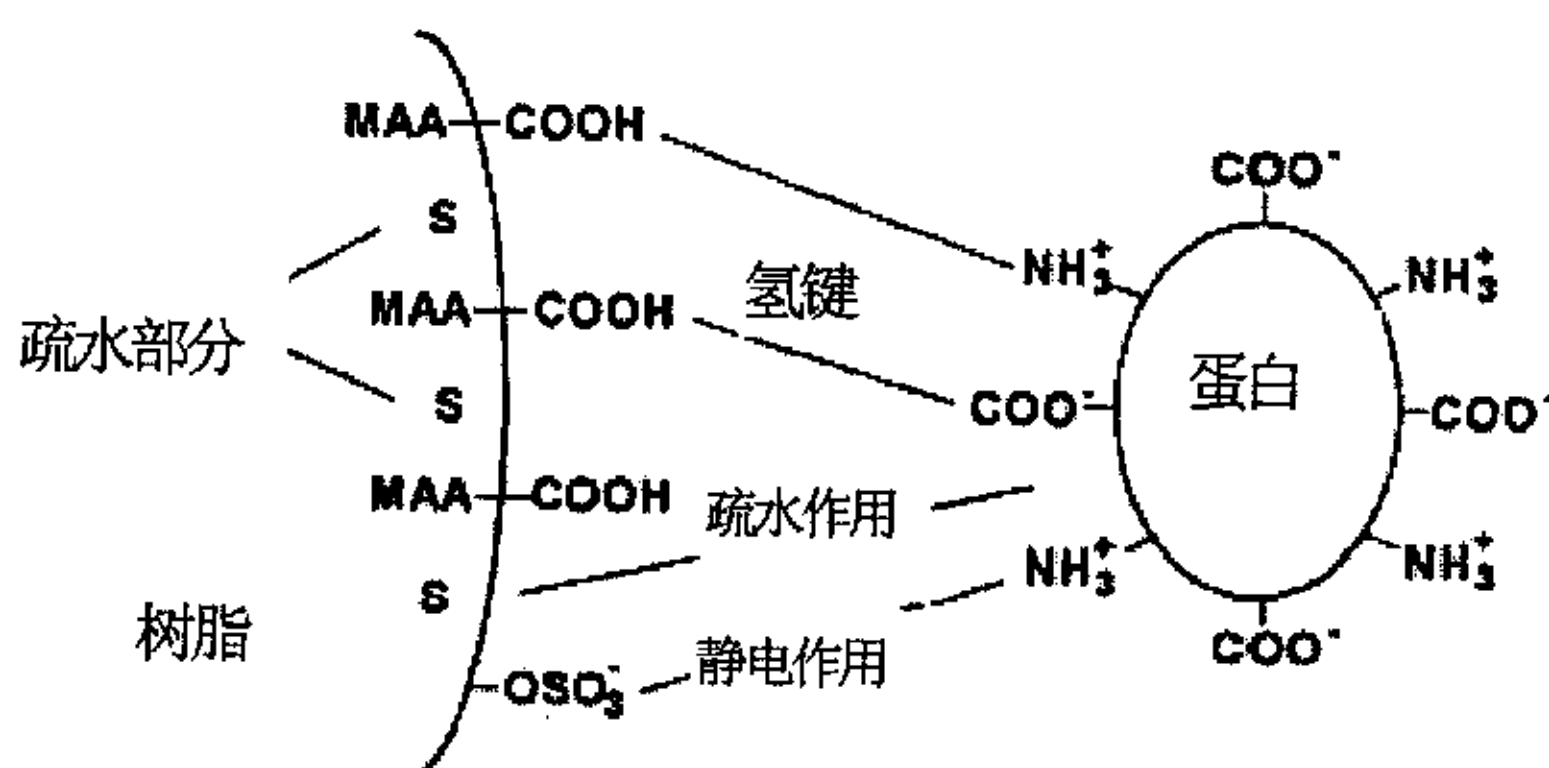


图 5.1.1 蛋白质在羧化树脂微球上的吸附作用示意图^[9]

吸附过程中蛋白质变性增加了蛋白质与吸附剂表面的接触面积,从而降低了蛋白质的脱附率。

为了简化膜吸附剂的预处理过程,避免料液对吸附剂的污染,第三章提出纤

维色谱的概念，并研制了表皮具有开孔结构的离子交换树脂填充纤维吸附剂。本章将在前述工作基础上重点研究影响纤维吸附剂吸附与脱附性能的操作因素。

5.2 实验部分

5.2.1 原材料

基质材料：聚醚砜（PES）：型号 Ultrason[®]E6020P，重均分子量约为 50000，由 BASF 制造。

功能性微粒：Lewatit 离子交换树脂（CER）：型号：CNP80，弱酸阳离子交换树脂，树脂粉末平均粒径约 10 微米，Bayer 公司提供。

溶剂：二乙二醇单乙醚（DEGMEE）（合成级）、甘油、乙醇（CP）、正己烷（CP），Merck 公司提供。

蛋白质模型物：牛血清蛋白（BSA）：Fraction V，Sigma 提供。

新鲜的缓冲溶液用超纯水配制，超纯水是用 Millipore 公司 Milli-Q plus 单元制造的，其电导率为 18MΩ·CM。

以上所有物品未进一步纯化直接使用。

5.2.2 树脂填充纤维吸附剂的制备

纤维吸附剂的制备同第三章。本研究使用的纤维吸附剂性能及其 SEM 结果如表 5.2.1 和图 5.2.1 所示。图 5.2.2 为两种不同处理方法所得纤维吸附剂的形态结构。

表 5.2.1 树脂填充纤维吸附剂的性能

聚合物基质	树脂		纤维的形状与尺寸		吸附剂结构类型	
	类型	填充量 /%	形状	直径/mm	表皮致密	表皮开孔
聚醚砜（PES）	CER(CNP80ws)	50	实心 纤维	0.5~0.6	airgap	DEGMEE

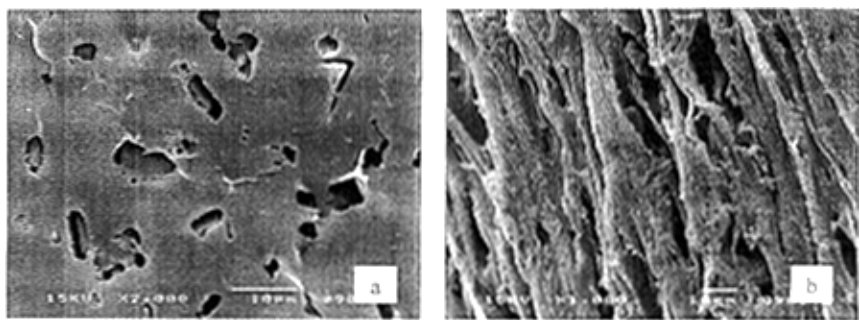


图 5.2.1 树脂填充纤维吸附剂的表面形态结构：a-air gap; b-DEGMEE

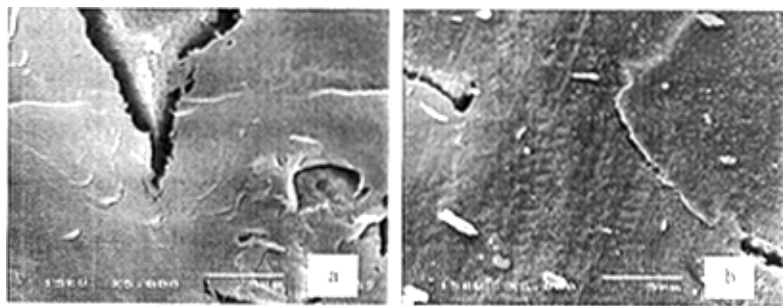


图 5.2.2 处理后纤维吸附剂表面形态结构

(a) 甘油处理; (b) 乙醇-己烷连续处理

5.2.3 纤维吸附剂的表征

5.2.3.1 纤维吸附剂的蛋白质静态吸附容量

纤维吸附剂的蛋白质静态吸附容量可用牛血清蛋白的间歇实验确定。已知量的吸附剂样品在 BSA 缓冲溶液中浸泡平衡后，测量 24 小时单位重量样品的牛血清蛋白吸附量。

在吸附试验中缓冲溶液采用 pH4.5,100mM 的醋酸缓冲液，此 pH 低于蛋白质的等电点，使蛋白质呈正电，而纤维吸附剂带负电荷，蛋白质被包裹在纤维基体内阳离子交换树脂吸附，结果造成了本体中蛋白质浓度降低。通过测量牛血清蛋白浓度的变化计算吸附剂的蛋白质吸附量，单位为 mg BSA/g 吸附剂。

BSA 浓度在 280nm 波长下用 Philips PU 8720 UV/VIS 紫外可见光谱仪测定。

5.2.3.2 纤维吸附剂的蛋白质脱附

吸附蛋白后的样品首先用 pH4.5,100mM 的醋酸缓冲液快速冲洗 3 次，然后浸入 pH 高于蛋白质等电点的洗脱剂中使蛋白质脱附。在此 pH 下蛋白质净电荷转

变为负值, 由于电荷排斥作用蛋白质从多孔纤维基体内吸附点上脱附扩散进入本体溶液中。洗脱步骤的 BSA 浓度也用上述的方法在 280nm 检测。

所有的吸附与脱附试验均在 20℃ 恒温水浴振荡机内完成的, 振动频率为 100 次/分钟。

5.2.3.3 纤维吸附剂的再生

树脂填充纤维吸附剂的再生采用 5% HCl 水溶液。在盐酸水溶液中浸泡 24 小时后, 用纯水冲洗至中性, 即可用于新一轮吸附与脱附试验。

5.3 结果与讨论

5.3.1 蛋白质浓度的影响

蛋白质浓度对吸附的影响如图 5.3.1 和图 5.3.2 所示。料液蛋白质 BSA 浓度较高吸附剂的吸附容量较大。一方面, 从动力学角度, 较高的蛋白质浓度提供了较强的传质推动力, 随 BSA 浓度的提高纤维吸附剂的吸附速率变快; 另一方面, 从平衡理论角度, 较高的蛋白质浓度有利于吸附过程向形成蛋白质-吸附剂复合体的方向转化。

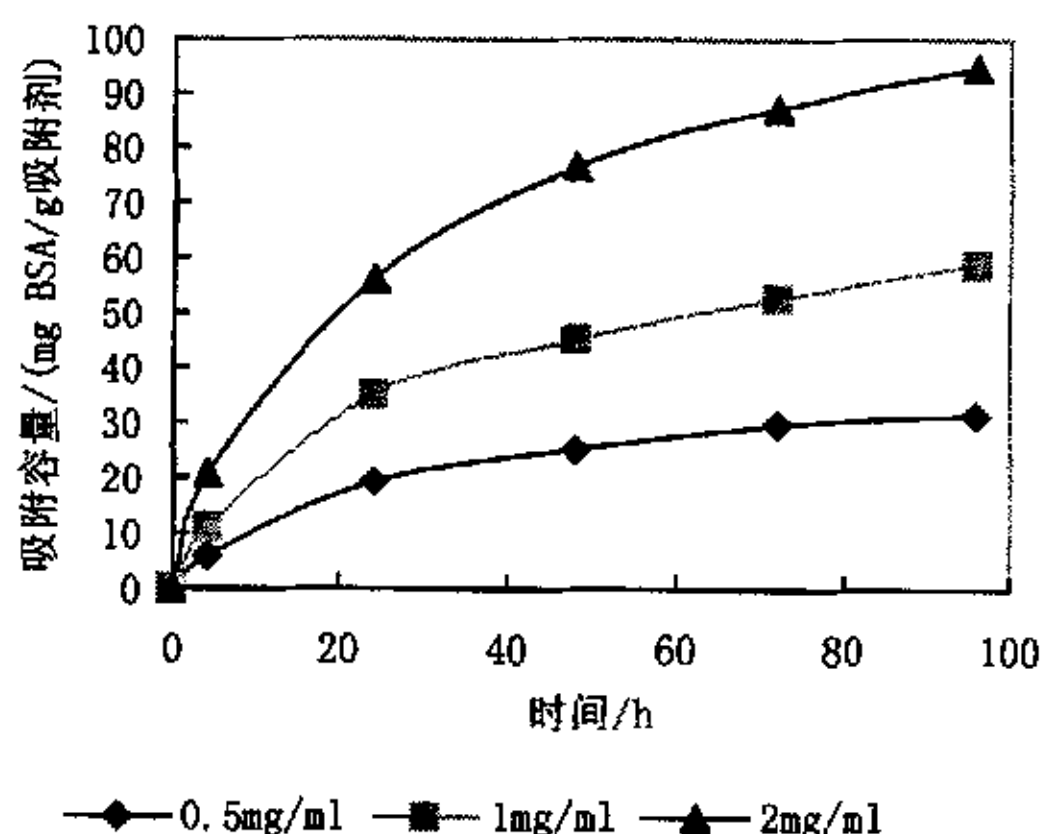


图 5.3.1 BSA 浓度对 airgap 类纤维吸附剂吸附性能的影响

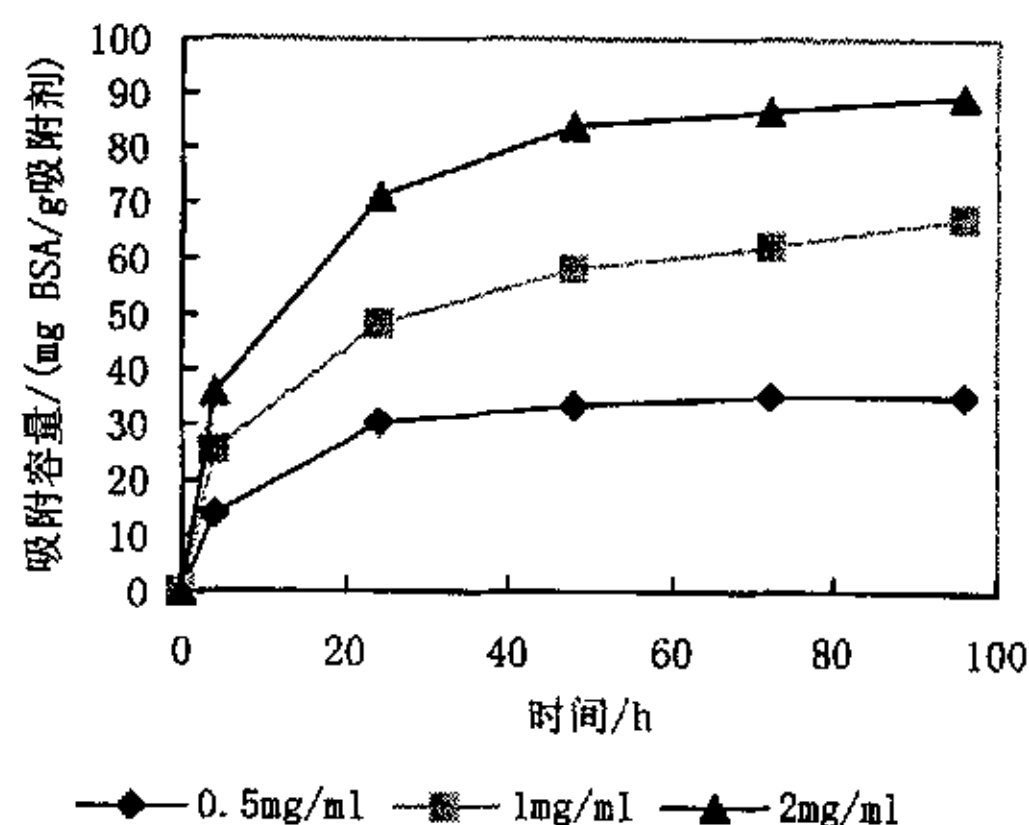


图 5.3.2 BSA 浓度对 DEGMEE 类纤维吸附剂吸附性能的影响

5.3.2 BSA 溶液 pH 的影响

蛋白质与离子交换树脂的基本作用原理是电荷之间的静电相互作用、极性基团之间的氢键作用、疏水部分的疏水作用等。在不同 pH 条件下, 各种因素对 BSA

与吸附剂的相互作用影响是不同的。从图 5.3.3 可知, 当 BSA 溶液 pH 高于 BSA 等电点 ($pI_{4.8\sim 5.2}$) 时, 吸附剂的吸附容量急剧降低。其原因是此条件下 BSA 的净电荷为负值, 并且树脂 CNP80ws 中的交换基团 $-\text{COOH}$ 的解离随溶液 pH 提高而变大, 由于同性电荷静电排斥作用, 使得吸附剂对 BSA 吸附能力大大减弱。

当 BSA 缓冲溶液的 pH 很低时, 由于低于树脂 CNP80ws 的等电点 ($pI=4.0$)^[10], 使得树脂 CNP80ws 的净电荷接近于 0。在这种情况下, 氢键作用对 BSA 与吸附剂吸附作用的贡献高于其它类型作用。此外, PES 基质本身所带净电荷也随缓冲溶液 pH 和离子强度的变化而变化。据报道 PES 超滤膜的等电点在 2.2~3.1 范围内^[11-13], 因此, 当 pH 低于 PES 的 pI 时 PES 对 BSA 的吸附作用减弱。另外, 在如此低的 pH 条件下, H^+ 再生作用也促进 BSA 从树脂的吸附点上解离。所有这些因素导致了在较低 pH 下吸附剂的吸附容量反而降低的结果。

当 BSA 溶液的 pH 接近 BSA 的 pI 时, 情况较为复杂。由于在此条件下 BSA 的净电荷接近于零, 氢键作用与疏水作用变得突出。但是, 这两种类型的作用对 pH 并不十分敏感, 所以在 pI 附近出现了一个吸附平台。

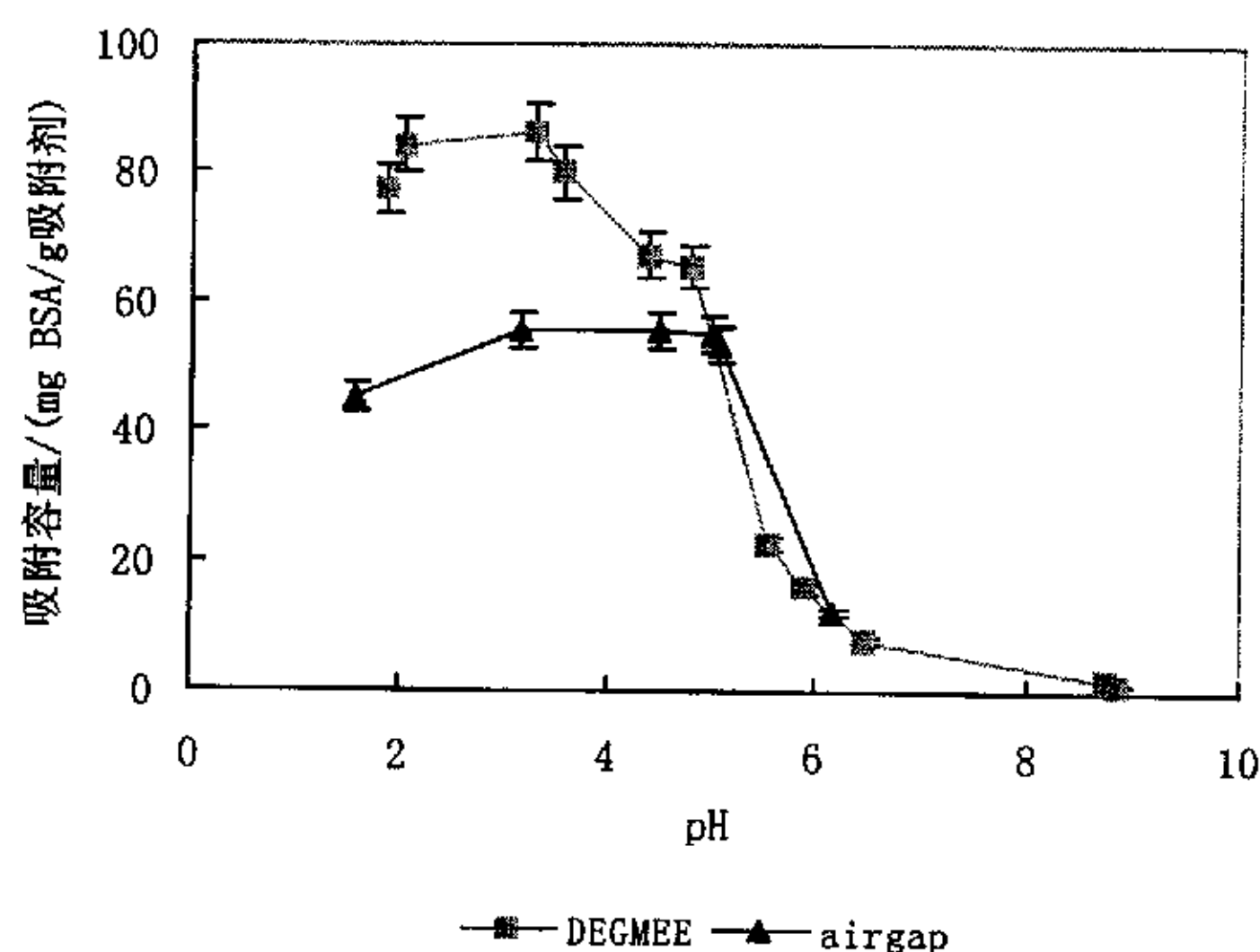


图 5.3.3 BSA 溶液 pH 对纤维吸附剂吸附性能的影响

(料液-2mg/ml BSA 缓冲溶液, CER(CNP80ws)填充量 50%)

图 5.3.4 和图 5.3.5 为不同 pH 的 BSA 溶液条件下树脂的蛋白质脱附性能。值得注意的是, 在较高 pH 条件下形成的 BSA-吸附剂复合体较易解离, 这个结果表明, 在不同 pH 条件下 BSA 与吸附剂的吸附机理是不同的。如上所述, 在较低的

pH 下氢键作用变得较为重要, 由于这种作用较强, BSA 在吸附剂中可能发生了变性, 导致 BSA 分子难以从吸附点完全脱附。本研究采用 pH4.5 的 BSA 缓冲溶液用于后述的吸附实验。

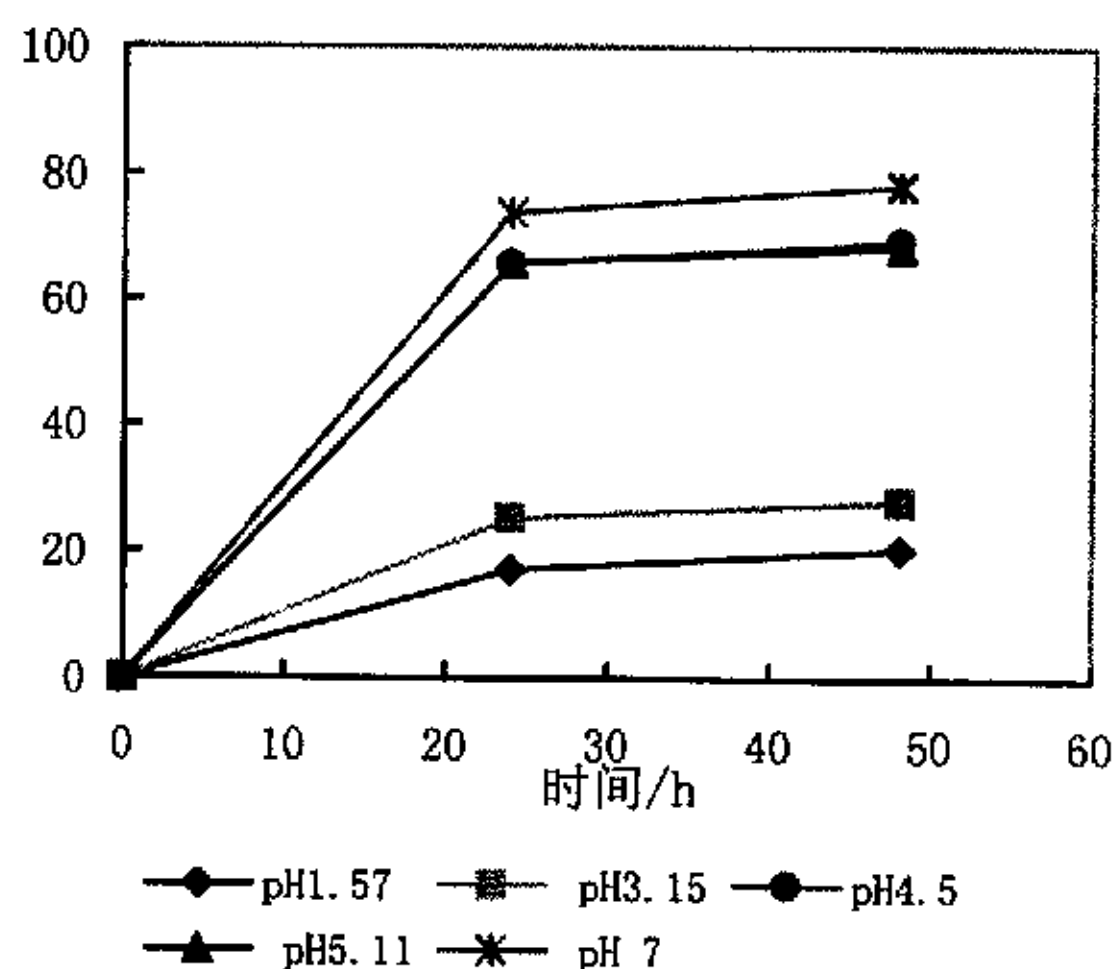


图 5.3.4 BSA 溶液 pH 对脱附率的影响
(DEGMEE 类吸附剂)

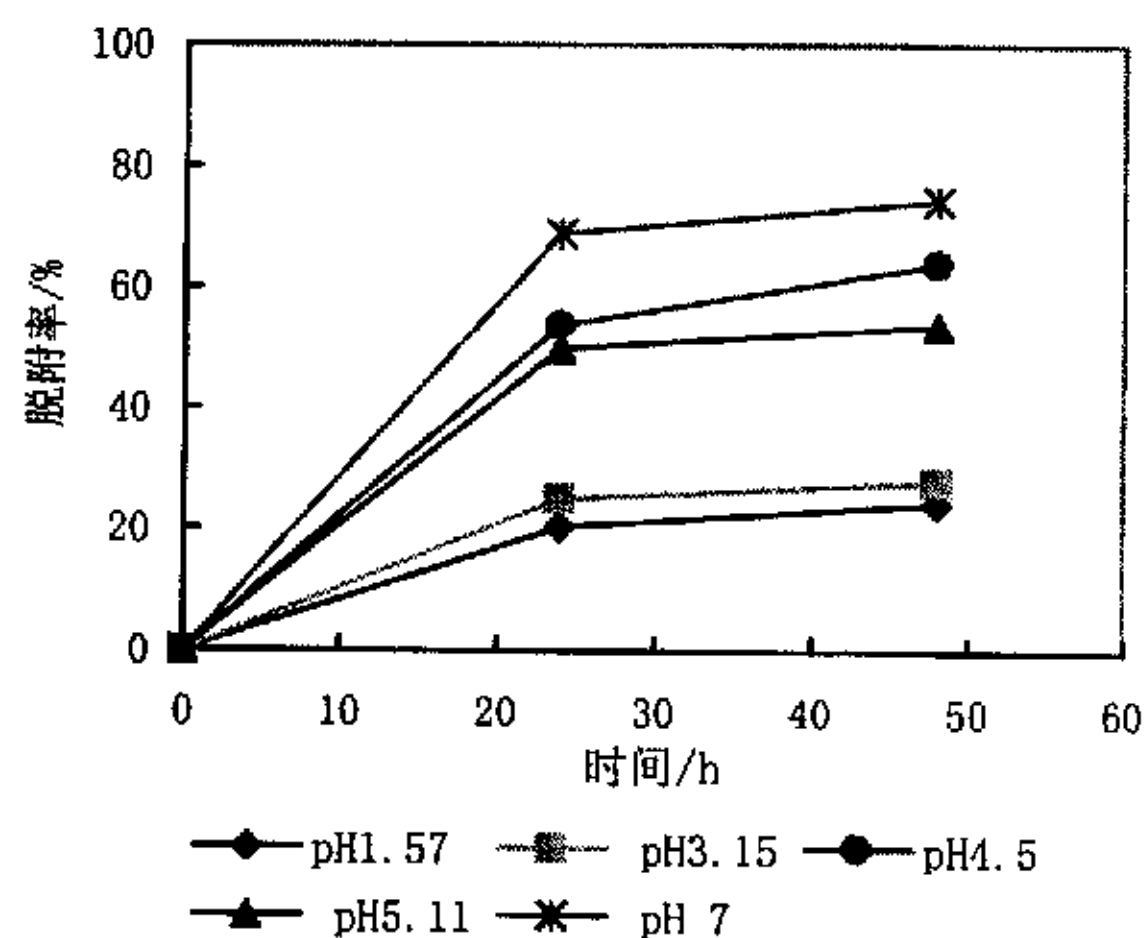


图 5.3.5 BSA 溶液 pH 对脱附率的影响
(airgap 类吸附剂)

5.3.3 洗脱液的选择

吸附在吸附剂上的蛋白质可通过洗脱的方法解离, 如直接洗脱、分步洗脱、梯度洗脱、酸碱再生处理等。但需注意的是, 在洗脱操作过程中应尽量避免造成蛋白质的变性。对于离子交换类型吸附剂, 洗脱液的 pH 和离子强度是重要的参数。这是因为当溶液 pH 从低于蛋白质等电点到高于其等电点时, 蛋白质的净电荷发生了转化, 所以通过调整洗脱液 pH 使蛋白质的净电荷发生转变的方法, 实现蛋白质从蛋白质-树脂复合体的脱附。较高的离子强度有利于蛋白质从吸附点解离。对于阳离子交换树脂类型吸附剂, 由于 BSA 等电点在 4.8~5.2 范围, 所以洗脱液的 pH 应高于 BSA 等电点。图 5.3.6 表明, 洗脱液 pH 较高, 蛋白质的脱附率较大; 当洗脱液 pH 为 4.5 时, 蛋白质的脱附率极低。另外, 洗脱液加入 1M NaCl 提高了蛋白质的脱附率, 其原因是 NaCl 的加入增大了缓冲溶液离子强度, 减弱了 BSA 与吸附点的相互作用, 促使蛋白质从吸附点脱附。因此, 本研究采用 pH=9 的 Tri-HCl 缓冲溶液用于后述脱附实验。

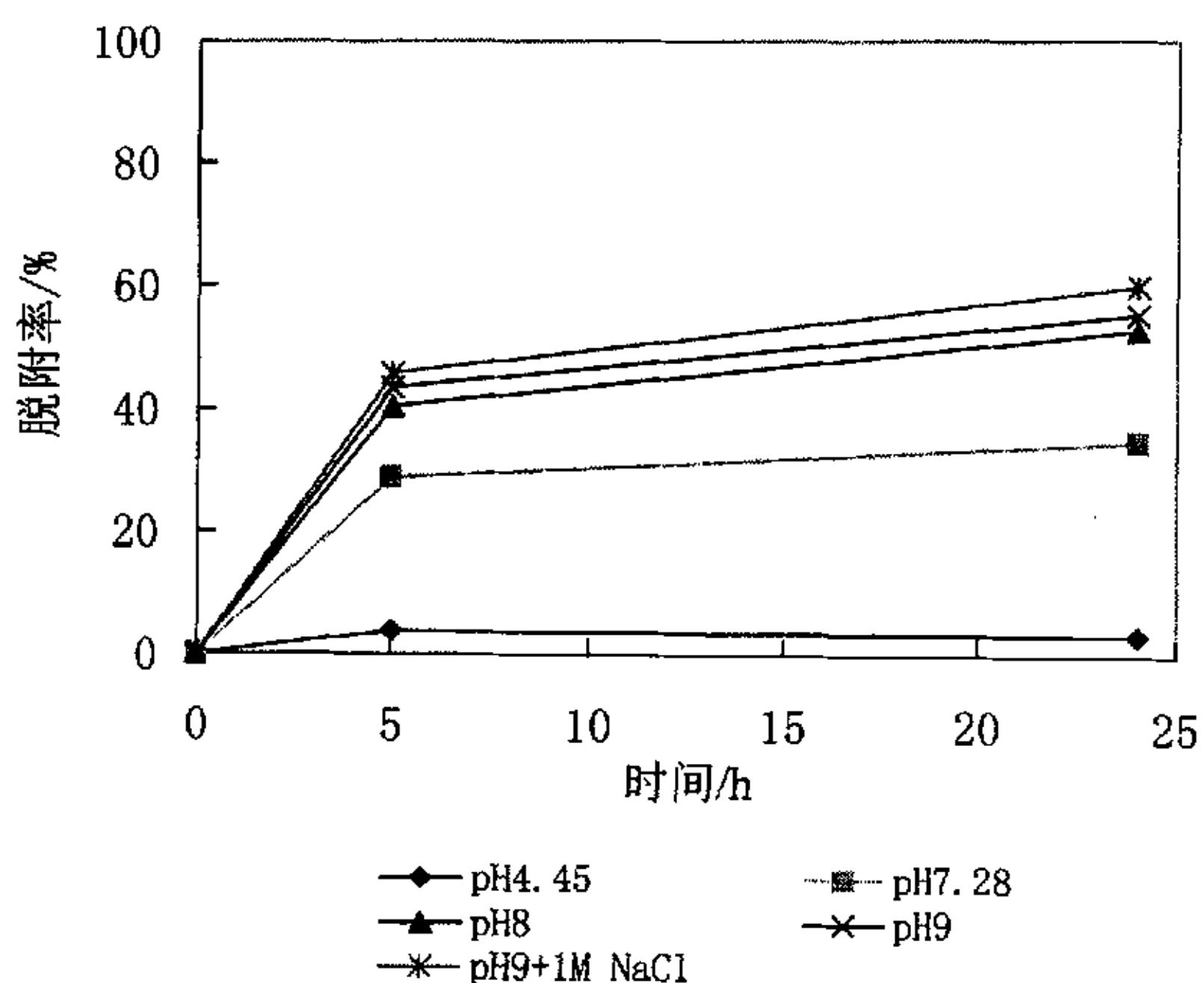


图 5.3.6 不同 pH 条件下蛋白质的脱附率
(类型-DEGMEE; 料液-2mg/ml, pH4.45 缓冲溶液)

5.3.4 吸附剂预处理方法的影响

在进行分离操作前，吸附剂首先要经过缓冲溶液的润湿，不同预处理剂对蛋白质的吸附与脱附性能的影响如图 5.3.7~5.3.10 所示。氯化钠溶液可以提高溶液的离子强度，有时也用作强酸树脂的再生剂，因此，本研究探讨了以氯化钠溶液为再润湿剂的可能性。结果表明，采用氯化钠盐溶液再润湿的吸附剂其吸附容量低于其他预处理方法，其原因是氯化钠盐溶液润湿的吸附剂基体内具有较高的离子强度，这减弱了 BSA 与树脂的相互作用。

盐酸水溶液经常用于阳离子交换树脂的再生，期望经过盐酸溶液处理后树脂填充纤维吸附剂有更多吸附点被更新。由图可见，采用 5% 盐酸溶液润湿的吸附剂，它对蛋白质的吸附容量较高。然而，此方法处理的吸附剂在脱附过程中脱附率较低（图 5.3.9 和图 5.3.10），其原因是经盐酸溶液处理后 BSA 与树脂的作用较强，甚至在吸附过程中可能发生蛋白质变性。

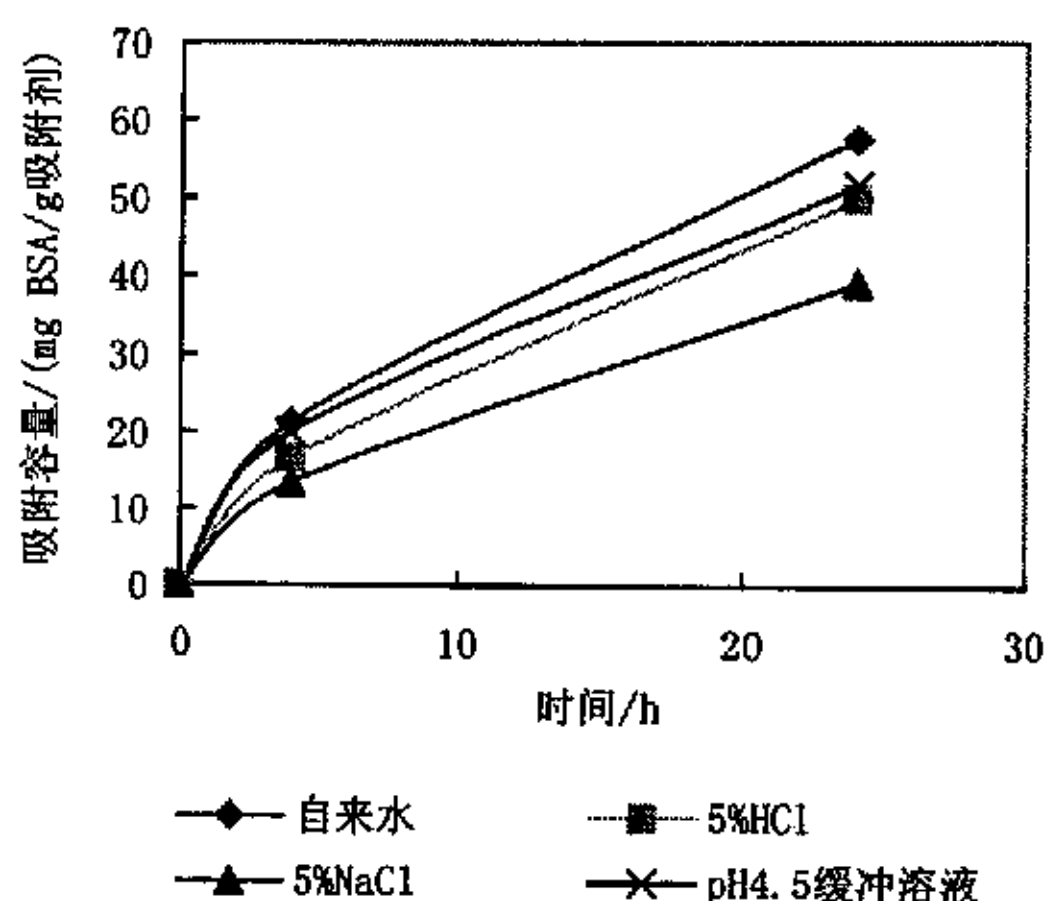


图 5.3.7 airgap 类型纤维吸附剂的预处理对吸附的影响

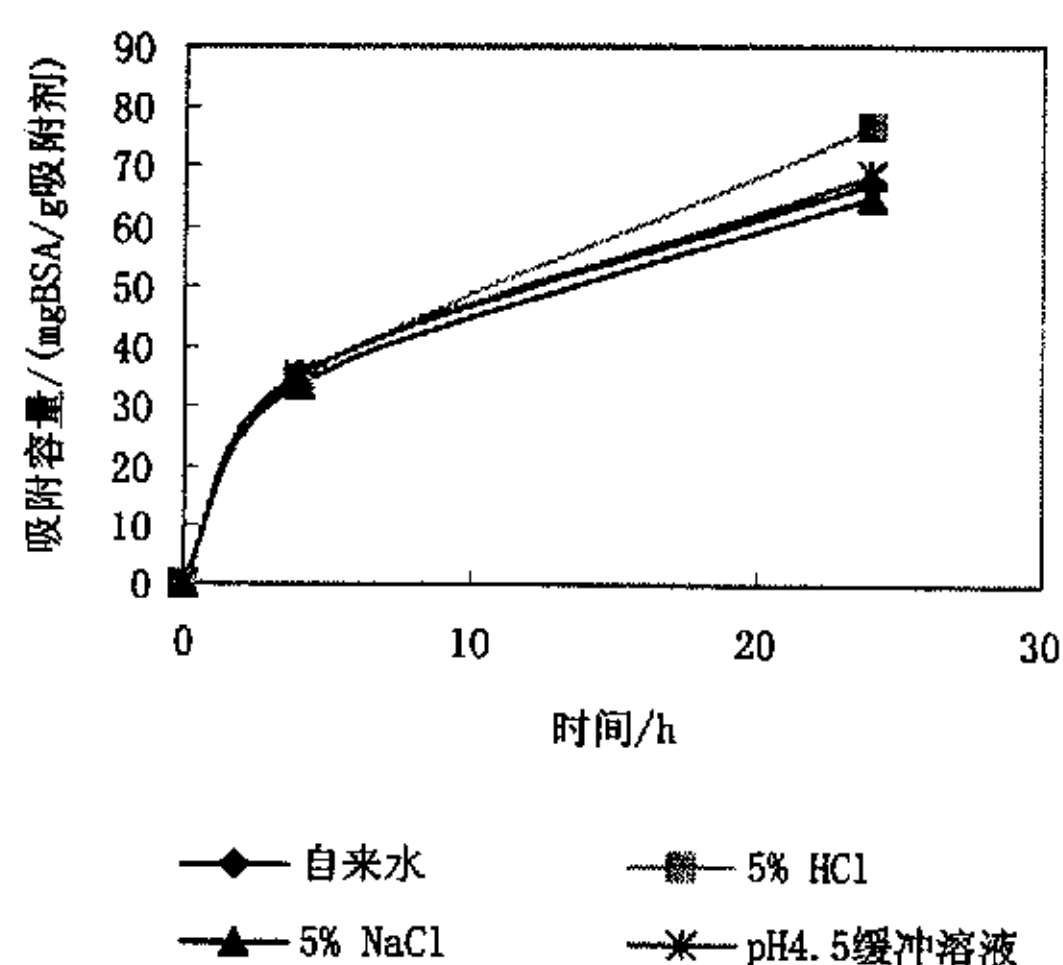


图 5.3.8 DEGMEE 类型纤维吸附剂的预处理对吸附的影响

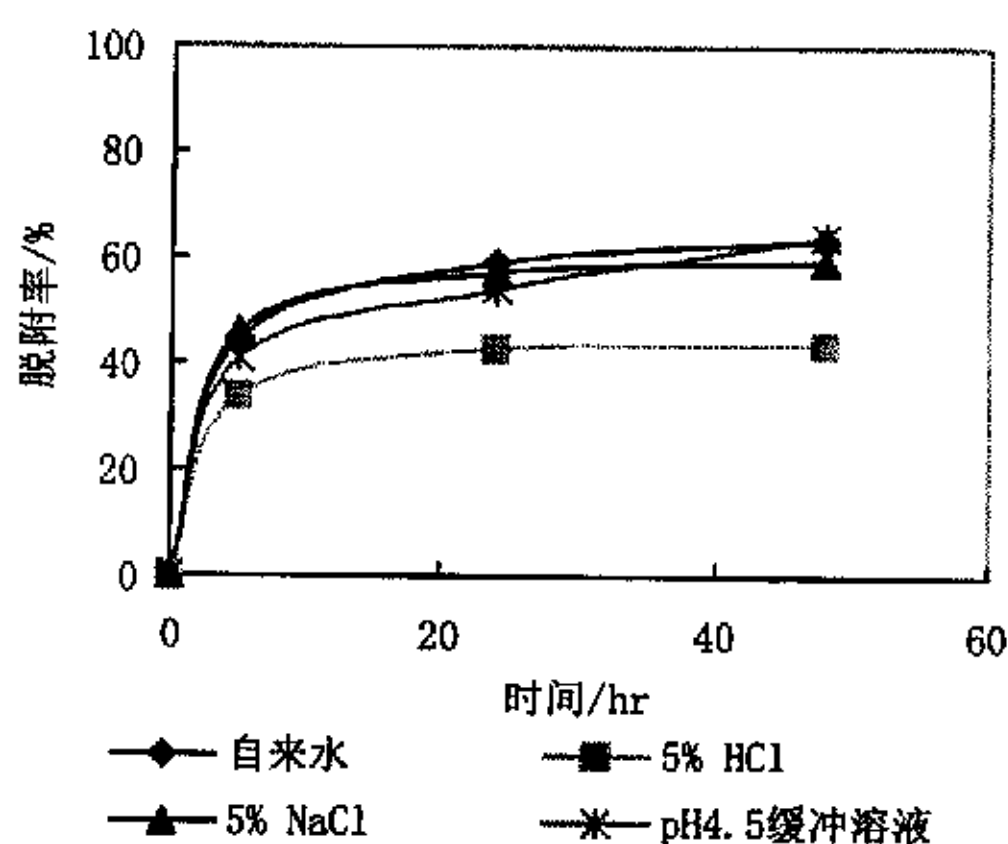


图 5.3.9 airgap 类型纤维吸附剂的预处理对脱附的影响

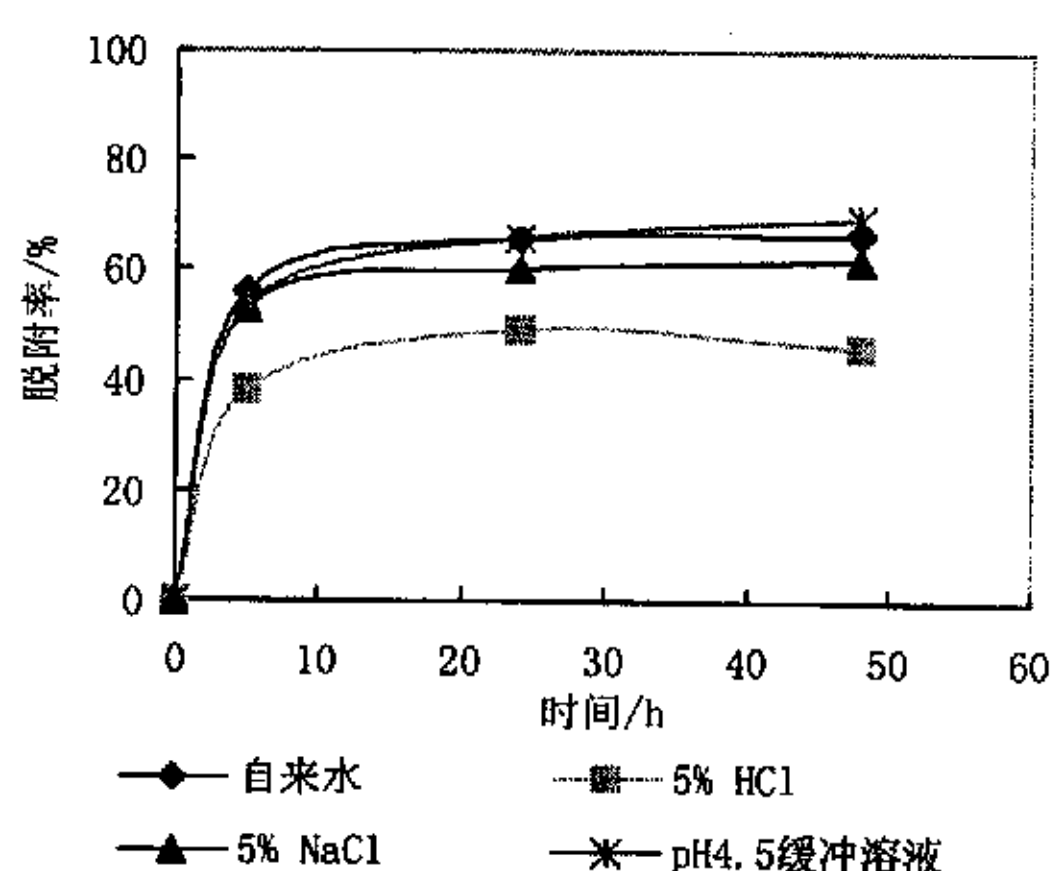


图 5.3.10 DEGMEE 类型纤维吸附剂的预处理对脱附的影响

5.3.5 纤维吸附剂后处理的影响

纤维吸附剂后处理的目的是便于吸附剂的储存与使用。表 5.3.1 列出了几种方法处理吸附剂的实验结果。结果表明，采用较高浓度甘油处理的纤维吸附剂，其吸附容量与未处理的湿态吸附剂相当，但其脱附率较低。如图 5.2.2 (a) 所示，树脂填充纤维吸附剂经甘油处理后其结构并未发生明显变化，所以其吸附容量未减少，但由于吸附在此吸附剂上的部分蛋白质可能发生了变性，使蛋白质的脱附率降低。

表 5.3.1 后处理对纤维吸附剂的吸附与脱附性能的影响

后处理方法	吸附容量/(mg BSA/g 吸附剂)		脱附率/%	
	Air gap 类型	DEGMEE 类型	Air gap 类型	DEGMEE 类型
未处理	60.9	71.2	50.5	64.3
自然干燥	48.7	71.2	50.9	61.6
热处理	47.5	47.3	44.6	51.6
40% 甘油溶液	65.8	70.6	41.3	53.9
EtOH/己烷连续处理	30.6		46.6	

操作条件: 料液-2mg/ml, pH4.45 BSA 缓冲溶液; 洗脱液-pH9.20 Tris-HCl 缓冲溶液

如表 5.3.1 所示, 热处理的方法不利于蛋白质的吸附, 这可能是经热处理后吸附剂的孔径和孔隙率变小而疏水性增强的缘故。由于经过乙醇与己烷连续处理后纤维吸附剂的表皮较为致密 (见图 5.2.2b), 所以该吸附剂的吸附容量较低 (表 5.3.1)。因此, 本研究采取室温自然干燥的方法处理纤维吸附剂。

5.3.6 料液流动状态的影响

如图 5.3.11-5.3.14 所示, BSA 溶液的振动有利于吸附剂的吸附与脱附。对于表皮具有开孔结构的吸附剂 (DEGMEE 类型), 在初始阶段振动对吸附的影响比皮层致密的吸附剂要大, 意味着由 BSA 溶液振动引起的剪切力促进了 BSA 分子的传质。洗脱液的振动也同样有利于蛋白质从其吸附点上解离, 特别对于表皮致密的吸附剂更为明显 (airgap 类型), 这是因为洗脱液的振动促进蛋白质从吸附剂表面到本体溶液的传质。

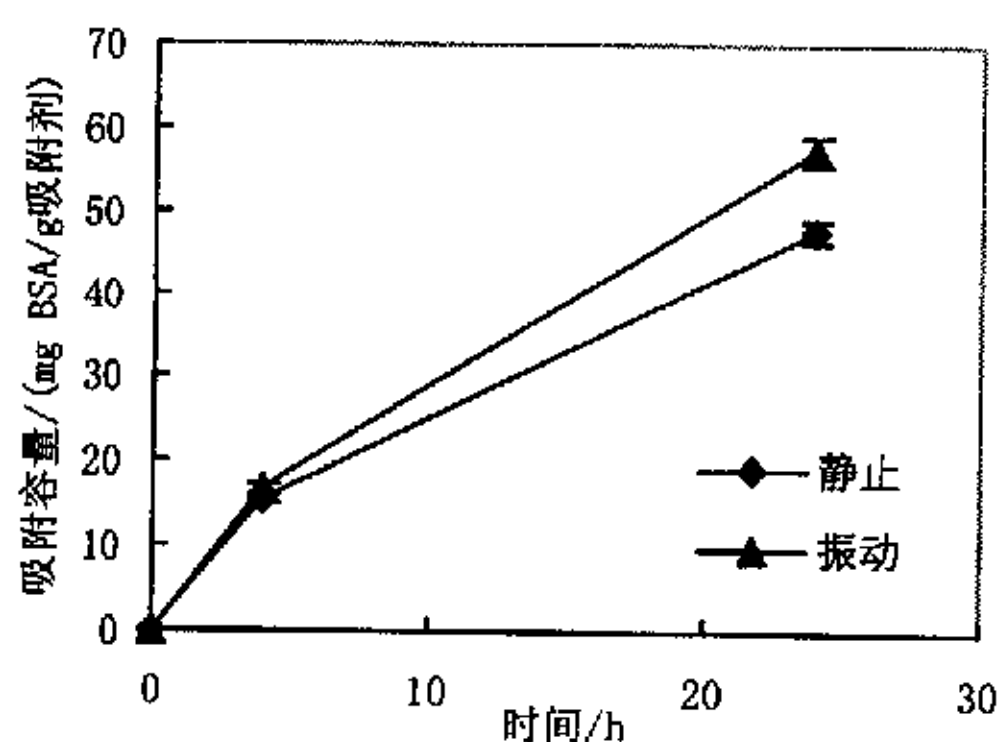


图 5.3.11 振动对 airgap 类吸附剂吸附性能的影响

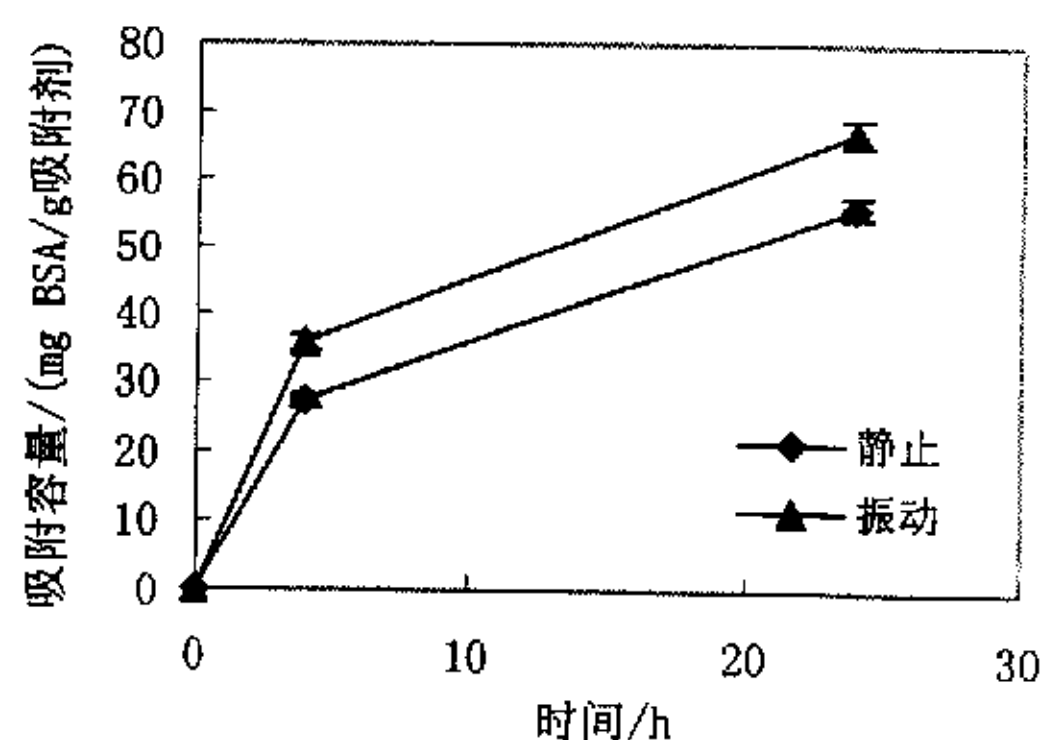


图 5.3.12 振动对 DEGMEE 类吸附剂吸附性能的影响

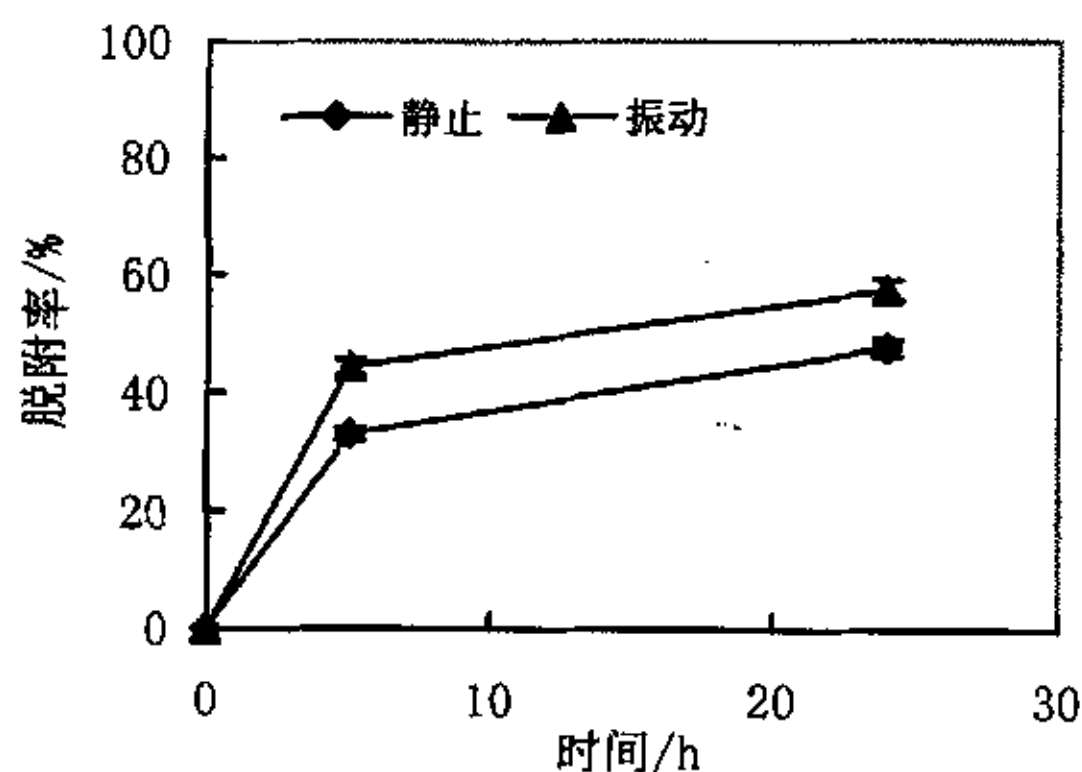


图 5.3.13 振动对 airgap 类吸附剂脱附性能的影响

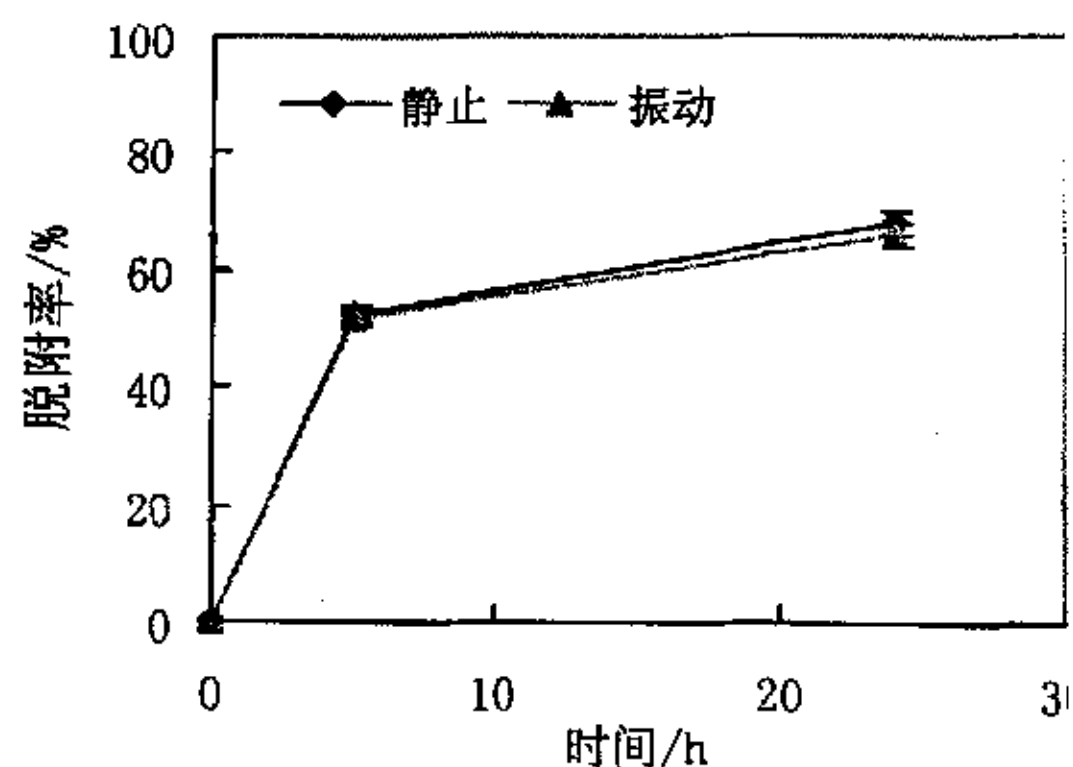


图 5.3.14 振动对 DEGMEE 类吸附剂脱附性能的影响

5.3.7 纤维吸附剂的再生

在脱附过程中，由于吸附在吸附剂中的蛋白质未能完全脱附，对纤维吸附剂进行再生是必要的，再生可使吸附剂多次重复使用。图 5.3.15 表明，采用 5%~10% 盐酸溶液对树脂填充纤维吸附剂进行第一次再生是有效的，第一次再生后吸附剂的吸附容量增加，意味着再生剂清除并再生了被其他杂质占据的吸附点。但其后再生周期内吸附剂的吸附容量逐渐下降，说明由于蛋白质变性等原因使被吸附的蛋白质未能被再生剂完全清除。吸附剂的再生效果对脱附的影响如图 5.3.16 所示，可以看出，再生后吸附剂的脱附率逐步降低。

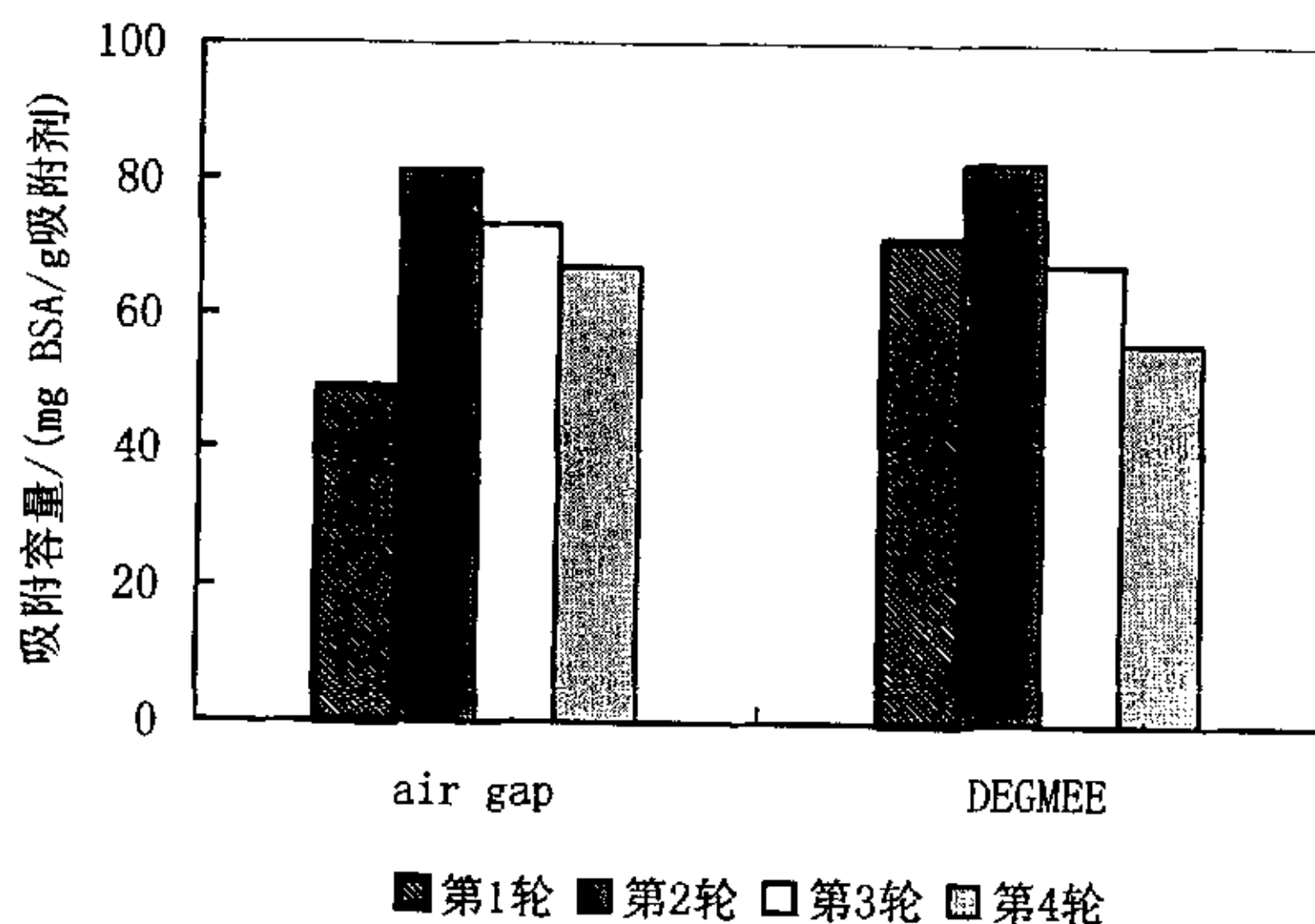


图 5.3.15 再生对吸附性能的影响

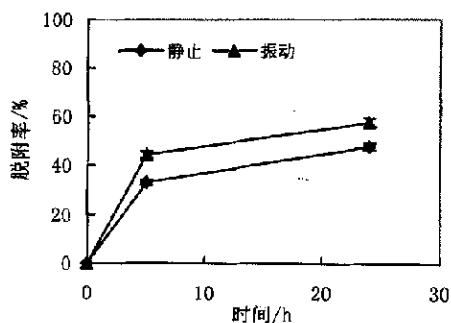


图 5.3.13 振动对 airgap 类吸附剂脱附性能的影响

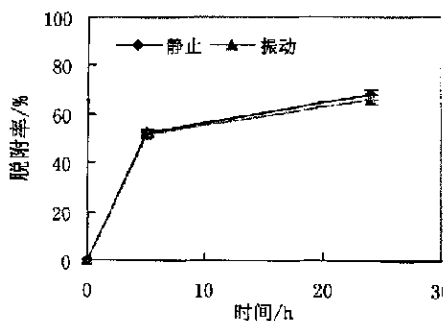


图 5.3.14 振动对 DEGMEE 类吸附剂脱附性能的影响

5.3.7 纤维吸附剂的再生

在脱附过程中，由于吸附在吸附剂中的蛋白质未能完全脱附，对纤维吸附剂进行再生是必要的，再生可使吸附剂多次重复使用。图 5.3.15 表明，采用 5%~10% 盐酸溶液对树脂填充纤维吸附剂进行第一次再生是有效的，第一次再生后吸附剂的吸附容量增加，意味着再生剂清除并再生了被其他杂质占据的吸附点。但其后再再生周期内吸附剂的吸附容量逐渐下降，说明由于蛋白质变性等原因使被吸附的蛋白质未能被再生剂完全清除。吸附剂的再生效果对脱附的影响如图 5.3.16 所示，可以看出，再生后吸附剂的脱附率逐步降低。

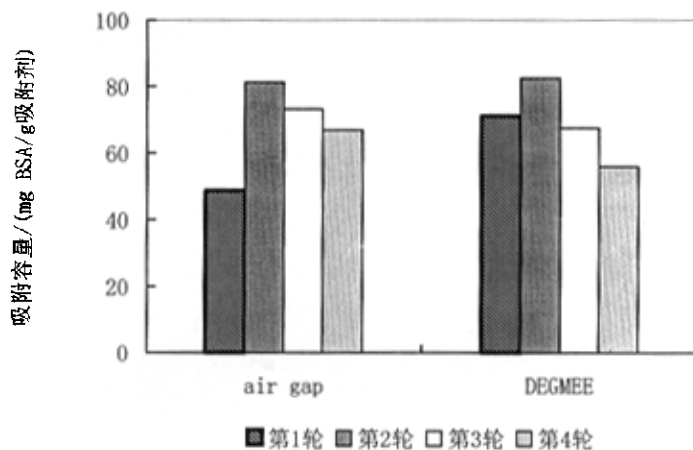


图 5.3.15 再生对吸附性能的影响

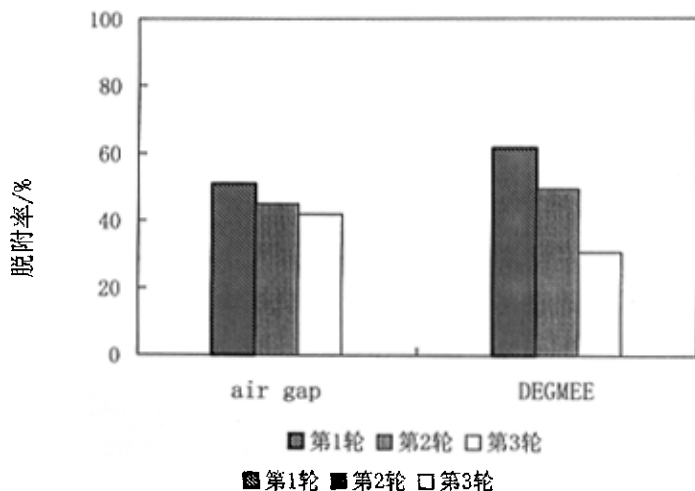


图 5.3.16 再生对脱附性能的影响

再生剂对 PES 基体的再生效果可参照无树脂填充的 PES 纤维再生的结果, 如图 5.3.17 所示。5%盐酸水溶液对表皮具有开孔结构的 PES 纤维再生效果并不理想, 表明吸附在聚合物基体上的蛋白质比较稳定, 难以完全再生。这可能是引起吸附剂再生效率逐渐降低的一个原因。

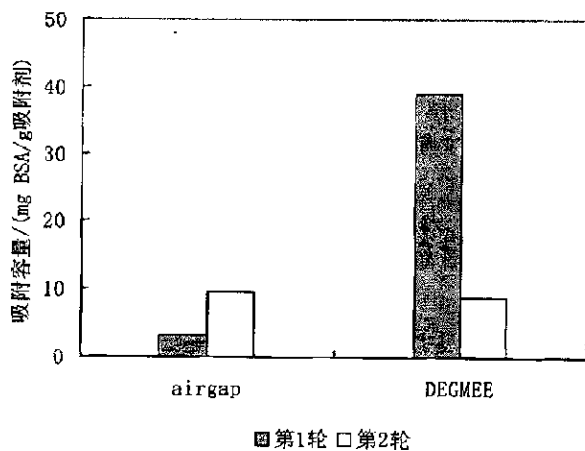


图 5.3.17 无填充树脂 PES 纤维的再生效果

(操作条件: Feed-2mg/ml pH4.45 BSA 缓冲溶液;
洗脱液-pH9.20 Tris-HCl 缓冲溶液)

5.4 本章小结

当离子交换类型纤维吸附剂用于蛋白质的分离时, 诸如料液 pH、溶质浓度、洗脱剂的 pH 和离子强度、吸附剂的预处理与后处理、吸附剂再生以及料液流动状态等参数是影响其吸附与脱附性能的操作因素。研究结果对吸附剂的实际应用具有重要的参考价值。

(1) 吸附过程中 BSA 溶液 pH 是一个非常重要的参数。当 BSA 溶液 pH 高于 BSA 的等电点时, 两种不同结构类型纤维吸附剂的吸附容量均较低。BSA 溶液 pH 不仅影响吸附剂的吸附性能也对 BSA 的脱附产生影响, 在高 pH 形成的 BSA 与吸附剂复合体较易解离。对于具有阳离子交换吸附功能的纤维吸附剂来讲, 吸附过程中 BSA 溶液 pH 应略低于其等电点。

(2) 在脱附过程中洗脱剂的选择是一个需考虑的重要因素。对于离子交换类型吸附剂, 洗脱剂的 pH 和离子强度是重要的影响因素。较高 pH 的洗脱液具有较好的脱附性能。当洗脱液的 pH 低于 BSA 等电点时, BSA 脱附率很低。

(3) 树脂填充吸附剂经再生剂再生后可以重复使用, 从而提高了其经济性。研究表明, 5%盐酸溶液对阳离子交换树脂杂化 PES 纤维吸附剂的再生有效但效果并不是很理想, 仍有部分吸附点未被再生。

此外, 吸附剂的预处理和后处理、料液 BSA 浓度及其流动状态等因素对吸附-脱附过程的影响也需要考虑。

5.5 参考文献

- 1) J. Thommes and M. R. Kula, Membrane Chromatography-An Integrative Concept in the Downstream Processing of Proteins Biotechnol. Prog., 11 (1995) 357-367
- 2) Elias Klein, Affinity membranes: a 10-year review J. Membrane Science 179 (2000) (1-27)
- 3) Catherine Charcosset, Purification of Proteins by Membrane Chromatography, J. Chem.Technol. Biotechnol., 71 (1998) 95-110
- 4) Raja Ghosh, Protein separation using membrane chromatography:opportunities

- and challenges J.Chromatography A, 952 (2002) 13–27
- 5) D. Keith Roper, Edwin N. Lightfoot, Separation of biomolecules using adsorptive membranes , J. Chromatography A , 702(1995) 3-26
 - 6) Henk Lingeman, Sacha J.F. Hoekstra-Oussoren; Particle-loaded membranes for sample concentration and/or clean up in bioanalysis; J.Chromatography B,689(1997)221-237
 - 7) M. Avramescu Membrane adsorbers development and applications PhD thesis, University of Twente (2002)
 - 8) Ulber, R., Plate, K., Weiss, T., Demmer, W., Buchholz, H., Scheper, T.
Downstream Processing of Bovine Lactoferrin from Sweet Whey Acta Biotechnol.
21 (2001) 1, 27–34
 - 9) J.-Y. Yoon, et al., Adsorption of BSA on Highly Carboxylated
Microspheres--Quantitative Effects of Surface Functional Groups and Interaction
Forces, J.Colloid and Interface Science, 1996, 177(2), 613-620
 - 10) M. R.Ladish, Bioseparation engineering: Principles, practice and economics,
Wiley-Interscience New York, 2001
 - 11) D. B. Burns, A. L. Zydney, J. Membrane Sci. 172 (2000) 39.
 - 12) L. Ricq, A. Pierre, S. Bayle, J-C Reggiani, Desalination 109(1997) 253.
 - 13) M. Pontie, X. Chasseray, D. Lemordant, J. M. Laine, J. membrane Sci.
129(1997) 125.

第六章 阳离子交换树脂填充 EVAL 纤维吸附剂的制备与表征

摘要

为了减弱基质材料对生物大分子的非特异性吸附,本章选择具有亲水性的乙烯-乙醇共聚物(EVAL)作为纤维吸附剂基质材料,Lewatit 阳离子交换树脂 CNP80ws 为功能材料,采用外部液体调控相分离方法,制备不同表面形态结构的树脂填充 EVAL 纤维吸附剂。当外部液体选用二乙二醇单乙醚和丙酮时,在纤维表面形成一定开孔度的多孔结构,并且随树脂填充量的提高纤维表面的粗糙度与开孔度有所提高。吸附实验结果表明,树脂填充 EVAL 纤维吸附剂的吸附容量约为 54mg BSA/g 吸附剂(树脂填充量 50%),较高树脂填充量使吸附剂具有较大的吸附容量。脱附实验结果表明,树脂填充 EVAL 纤维吸附剂的脱附率较高,远大于树脂填充 PES 纤维吸附剂的脱附率。另外,树脂填充 EVAL 纤维吸附剂的等温吸附曲线较好地符合朗格缪尔模型。

6.1 概述

如第三、四、五章所述,PES 纤维基体的形态结构和表面结构对蛋白质吸附具有较大影响。表皮致密的 PES 纤维对蛋白质的吸附较低,而具有开孔结构的 PES 纤维对蛋白质的吸附较为严重。脱附实验表明,吸附在 PES 基体的蛋白质难以完全解离,即使用酸性再生剂也难以完全使吸附点再生而达到完全活化的目的。这种不可逆吸附来源于蛋白质与基质的疏水作用。因此,本章选择新的纤维基质材料,制备吸附与脱附性能较好的纤维吸附剂。

为了降低传质阻力,第三章提出了颗粒填充纤维吸附剂应具有的理想结构,其中基质材料应避免生物大分子的非特异性吸附与变性,因此,要求所选择的聚合物应为亲水性的且净电荷为零。

Avramescu M. 等^[1]报道了采用树脂填充 EVAL 膜吸附剂分离纯化蛋白质混合物。他们以 EVAL 为膜的基质材料,离子交换树脂为功能颗粒,掺杂后通过相转化方法,制备了具有离子交换吸附功能的膜吸附剂。该吸附剂能有效地分离纯化

蛋白质的混合物。

另外, EVAL 分子结构中既含有亲水性乙烯醇链段, 又含有疏水性乙撑链段, 所以它具有如下特点: 亲水性适度、生物相容性较好、化学稳定性好, 溶出物少。它广泛用于生物工程与医学领域, 如人工脏器、血液透析、血浆分离等^[2-5]。

综上所述, EVAL 是一种优良的生物工程材料, 较好地符合纤维色谱基质材料的要求。本研究采用 EVAL 为基质材料, Lewatit 阳离子交换树脂 CNP80ws 为功能材料, 按照第三章使用的方法, 制备树脂填充 EVAL 纤维吸附剂, 并与其它类型吸附剂进行比较。

6.2 实验部分

6.2.1 原材料

基质材料: 乙烯-乙烯醇共聚物 (ethylene-vinyl alcohol copolymer, EVAL), 乙烯基含量 44%, 由 Aldrich 公司制造。

功能性微粒: Lewatit 阳离子交换树脂 (CER): 型号: CNP80ws (弱酸型大孔阳离子交换树脂), 树脂为粉末状, 其平均粒径约 10 微米, 由 Bayer 公司提供。

添加剂及其它溶剂: 辛醇 (CP)、二乙二醇单乙醚 (Diethylene glycol monoethyl ether, DEGMEE) (合成级)、丙酮 (AR) 由 Merck 公司提供。

溶剂: 二甲基亚砷 (DMSO), CP, 购自 Merck 公司。

蛋白质模型物: 牛血清蛋白 (BSA): Fraction V, Sigma 提供。

新鲜的缓冲溶液用超纯水配制, 超纯水是用 Millipore 公司 Milli-Q plus 单元制造的, 其电导率为 18MΩ.CM。

以上所有物品未经进一步纯化直接使用。

6.2.2 树脂填充纤维吸附剂与膜吸附剂的制备

6.2.2.1 树脂填充纤维吸附剂

将不同量的 Lewatit 离子交换树脂粉末 (CNP80) 缓慢地加入到浓度为 10%-14%EVAL 的 DMSO 溶液中, 制备不同吸附容量的吸附剂。在纺丝液中混入 10%-14%辛醇, 用作调节纤维形态结构的添加剂。

在纺制纤维时, 聚合物纺丝液从两孔喷丝头的中心管挤出, 外层环隙通入外

部溶剂，用于调控纤维的表面结构。挤出的纺丝细流经简短的空气间隙后进入水浴中，使之沉淀并发生相分离，整个纺丝过程如第三章图.3.4.1 所示。所有制备的纤维经水洗去除添加剂和溶剂后在空气中干燥存放。

纺丝操作条件：纺丝液温度：45℃，水浴温度：40℃，外部液体温度：20℃，室温：20℃，室内相对湿度：40%，空气间距：20mm，纤维缠绕速度：6-12m/min。

6.2.2.2 膜吸附剂

用于制备膜吸附剂的铸膜液配方和制备方法与纤维吸附剂纺丝液配方和制备方法相同。膜的制备方法同文献[1]。即将含树脂的铸膜液在玻璃板上用刮板刮膜后，立即浸入 40℃ 水浴中凝固成形。所有平板膜经水洗去除添加剂和溶剂后在空气中干燥存放。

6.2.3 纤维吸附剂的表征

6.2.3.1 吸附剂形态结构

纤维吸附剂的形态结构用 SEM 观察。样品的制备与观测同第三章。

6.2.3.2 BSA 浓度的测定

BSA 浓度可在 280nm 波长下用紫外可见光谱仪测定。本实验用 Philips PU 8720 UV/VIS 紫外可见光谱仪。

6.2.3.3 纤维吸附剂的蛋白质静态吸附容量

纤维吸附剂的蛋白质静态吸附容量可用牛血清蛋白的间歇实验确定。已知量的吸附剂样品在 BSA 缓冲溶液中浸泡平衡后（本实验取 24 小时），通过测量牛血清蛋白浓度的变化计算纤维吸附剂对蛋白质的静态吸附量，单位为 mg BSA/g 吸附剂。在吸附试验中缓冲溶液采用 pH4.5,100mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液，料液蛋白质 BSA 的浓度为 2mg/ml。

6.2.3.4 纤维吸附剂的蛋白质脱附

吸附蛋白后的纤维样品首先用 pH4.5,100mM 的醋酸-醋酸钠缓冲液快速冲洗 3 次，然后浸入 pH 高于蛋白质等电点的洗脱剂中使蛋白脱附。洗脱过程的 BSA 浓度也用上述的方法在 280nm 检测。本实验所用洗脱液是 pH9.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液。

另外，纤维吸附剂的再生试验方法同第五章。所有的吸附与脱附试验均在 20℃ 恒温水浴振荡机内完成的，振动频率为 100 次/分钟。

6.3 结果与讨论

6.3.1 阳离子交换树脂填充 EVAL 纤维吸附剂的制备及其形态结构

如前所述, 为了降低基质材料对溶质的非特异性吸附并减少溶质在纤维吸附剂基体内传质阻力, 本研究采用外部液体调控相分离的方法, 目的在于制备表皮具有开孔结构且基体为多孔的树脂填充 EVAL 纤维吸附剂。如图 6.3.1 所示, 当 DEGMEE 和丙酮为外部液体时, 纤维表面形成了一定开孔度的多孔结构。图 6.3.2 为该纤维吸附剂的横截面 SEM 结果, 可以看出, 被包裹在 EVAL 纤维基体内的树脂颗粒能够较为均匀地分布, 树脂颗粒周围具有一定的自由空间, 树脂表面形态结构清晰, 并未发现被 EVAL 覆盖。其成形机理与表皮具有开孔结构的树脂填充 PES 纤维的形成是相似的, 即外部液体渗入纺丝细流内降低了表皮附近聚合物浓度, 从而形成了表皮开孔而基体多孔的结构。

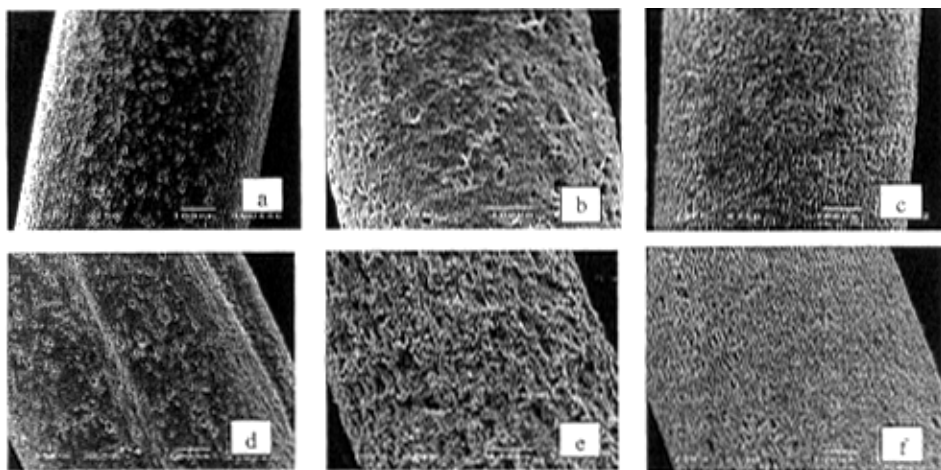


图 6.3.1 树脂填充 EVAL 纤维吸附剂的表面形态结构: a, b, c-树脂填充量 50%; d, e, f-树脂填充量 65%; a, d-未用外部液体, b, e-DEGMEE, c, f-丙酮

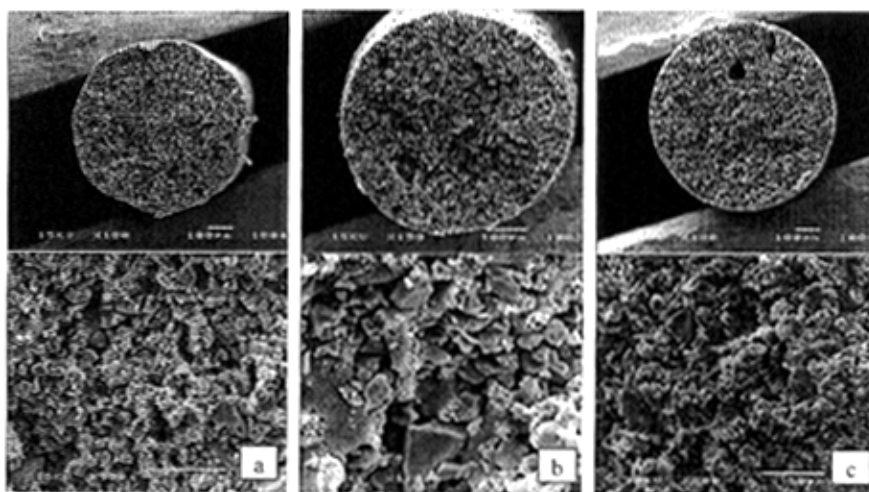


图 6.3.2 树脂填充 EVAL 纤维吸附剂的横截面 SEM 照片 (树脂填充量 50%):

a-未用外部液体, b-DEGMEE, c-丙酮

在树脂 CNP80ws 填充 EVAL 纤维制备过程中, 由于该配方纺丝原液粘度较低, 相分离速度较慢, 挤出液漂浮在水浴表面, 所以纺丝过程的控制难度较大。但外部液体的流动作用有助于纺丝细流成形, 使纺丝过程变得容易控制。实际上, 在本课题的初期, 我们首选的纤维基质聚合物是 EVAL, 原因有两个方面: 一方面, 本实验室正在进行以 EVAL 为基体的膜吸附剂的研究, 另一方面, 该聚合物具有适宜的亲水性和生物相容性。由于纺丝难以控制, 在该项目研究初期, 我们采用成膜性较好的 PES 作为纤维吸附剂的基质材料。如前几章所述, 树脂填充 PES 纤维吸附剂结构与性能基本达到了预期目的。

不同树脂填充量纤维吸附剂的形态结构如图 6.3.1 和图 6.3.3 所示, 树脂填充量较低时在纤维横截面上形成了较大的空腔结构。随树脂填充量增加, 纤维吸附剂内空腔消失, 结构变得较为均匀。这是由于当树脂的填充量较小时, 纺丝原液粘度较低, 在扩散诱导相分离过程中形成了基体具有空腔结构的纤维。另外, 随树脂填充量提高纤维的表面粗糙度增加, 使用外部液体如 DEGME 和丙酮制备的纤维吸附剂更为明显[图 6.3.1 (b, c)、6.3.1 (e, f)]。这与树脂填充 PES 纤维吸附剂具有相似的结果。

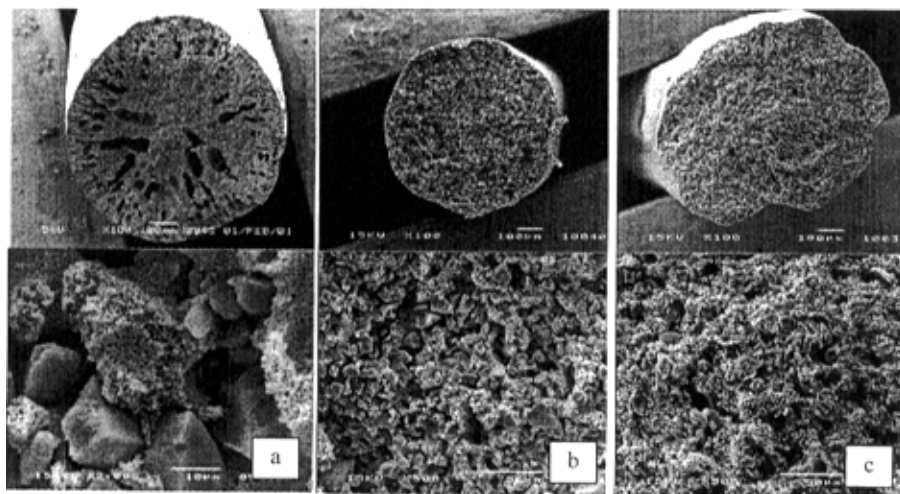


图 6.3.3 不同树脂填充量的树脂填充纤维吸附剂的横截面 SEM 照片：

a-33%, b-50%, c-65%

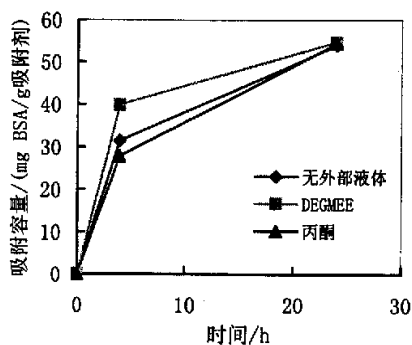
6.3.2 树脂填充 EVAL 纤维吸附剂对蛋白质 BSA 的吸附与脱附性能

6.3.2.1 纤维吸附剂结构因素对蛋白质 BSA 吸附与脱附性能的影响

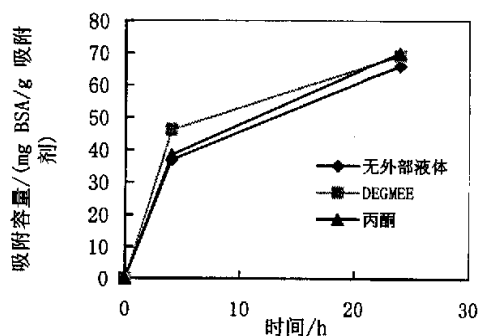
图 6.3.4 和图 6.3.5 为各种吸附剂对蛋白质 BSA 的吸附与脱附的实验结果。结果表明，吸附剂对 BSA 的静态吸附容量约 $54.4 \text{ mg BSA}/(\text{g 吸附剂})$ 。由于树脂 CNP80ws 的填充量为 50%，折合成树脂的吸附容量约 $108.8 \text{ mg BSA}/(\text{g 吸附剂})$ ，这与纯树脂 CNP80ws 的静态吸附容量（其值约为 $110 \text{ mg BSA}/\text{g 吸附剂}$ ）相当。这表明对吸附剂吸附容量的贡献主要来自于树脂的吸附，EVAL 基体对 BSA 吸附量很低，同时也说明 EVAL 对包裹树脂的活性基本没有影响。从图 6.3.5 可知，树脂填充 EVAL 纤维吸附剂的脱附率很高，均接近或高于 90%，表明 EVAL 作为基质材料是合适的。

另外，纤维表面结构的不同并未对吸附剂的吸附容量与脱附率产生较明显的影响（图 6.3.4 和图 6.3.5）。这与树脂 CNP80ws 填充 PES 纤维吸附剂是有区别的，其原因可能与相分离速率有关。由于树脂掺杂的 EVAL 纺丝液在相分离过程中相分离速率较慢，尽管在外部液体的作用下其表皮结构发生了变化，但其与内部的连通性较差，从而出现了表皮结构对吸附性能无明显影响的结果。

树脂填充量的增加使吸附剂的吸附容量变大（图 6.3.4），吸附剂的脱附率也略有升高（图 6.3.5）。



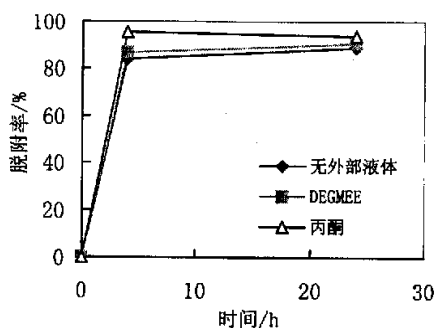
(a)



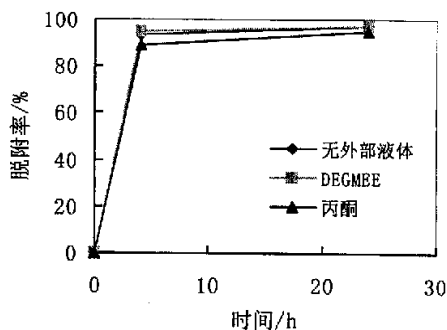
(b)

图 6.3.4 树脂 CNP80ws 填充 EVAL 纤维吸附剂的吸附性能:

(a) 树脂填充量 50%; (b) 树脂填充量 65%



(a)



(b)

图 6.3.5 树脂 CNP80ws 填充 EVAL 纤维吸附剂的脱附性能:

(a) 树脂填充量 50%; (b) 树脂填充量 65%

6.3.2.2 操作参数对蛋白质 BSA 吸附与脱附性能的影响

由图 6.3.6 可见,增加料液中 BSA 浓度树脂填充纤维吸附剂的吸附容量增大,其脱附率也随料液中 BSA 浓度增加而增大(图 6.3.7)。

试验过程中发现,BSA 缓冲溶液的振动有利于 BSA 从本体溶液到纤维基体内的传质过程,振动状态下吸附剂的吸附容量较高(图 6.3.8)。

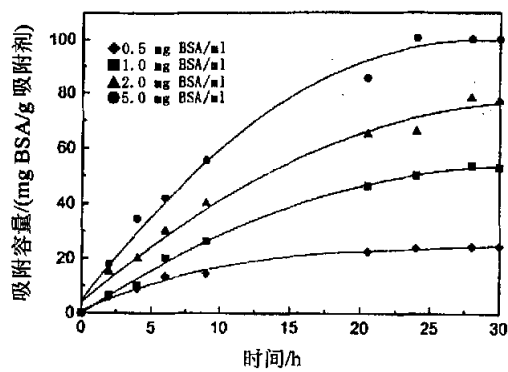


图 6.3.6 BSA 浓度对吸附性能的影响
(树脂 CNP80ws 填充量 65%，无外部液体使用)

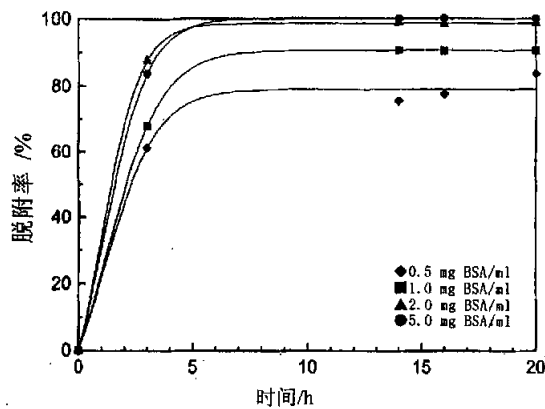


图 6.3.7 BSA 浓度对脱附性能的影响 (树脂 CNP80ws 填充量 65%，无外部液体使用)

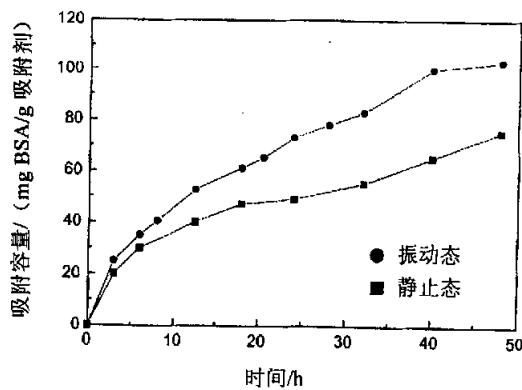


图 6.3.8 BSA 缓冲溶液振动对吸附剂吸附性能的影响
(树脂 CNP80ws 填充量 65%，无外部液体使用)

图 6.3.9 表明, 由于脱附不完全使得吸附剂中一部分活性吸附点仍被占据, 所以在吸附剂重复试验前, 有必要用适宜的再生剂对其再生。图 6.3.10 表明, 经过四次再生循环试验树脂填充 EVAL 纤维吸附剂的吸附性能没有明显降低, 吸附容量在 75~80mg BSA/g 吸附剂范围内, 说明树脂填充 EVAL 纤维吸附剂可重复使用性能较好。

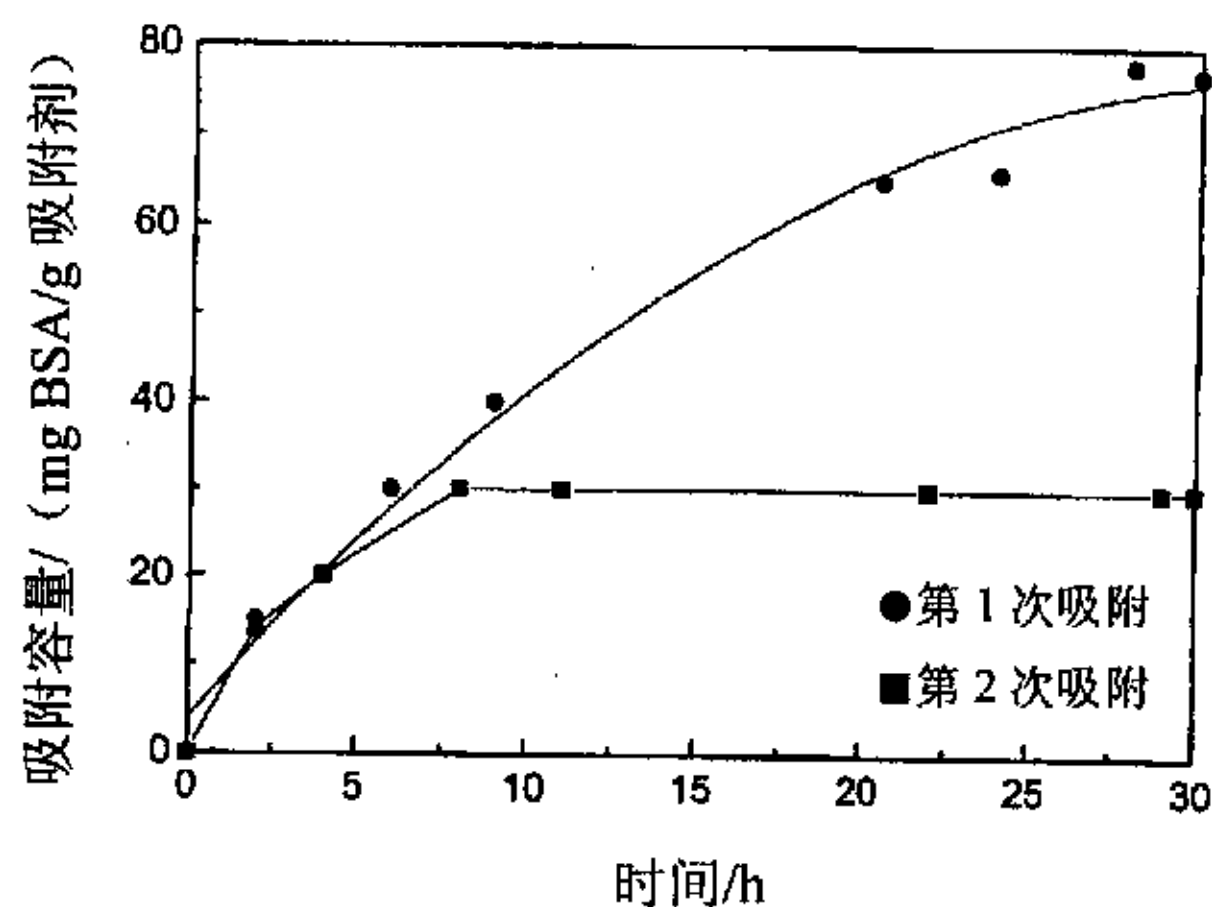


图 6.3.9 脱附后吸附剂未被再生直接重复使用的结果
(树脂 CNP80ws 填充量 65%, 无外部液体使用)

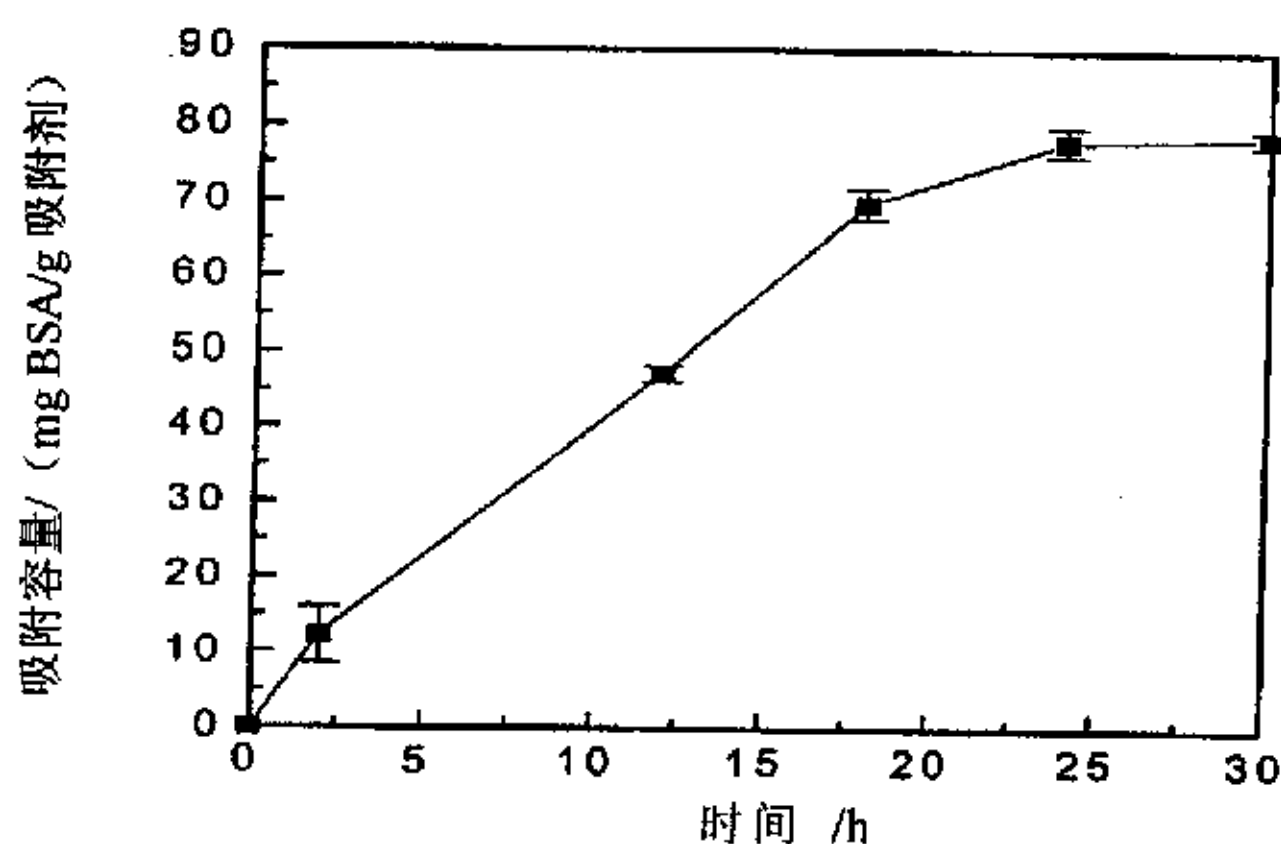


图 6.3.10 四次循环再生后吸附剂吸附性能的变化
(树脂 CNP80ws 填充量 65%, 无外部液体使用)

6.3.3 树脂填充 EVAL 纤维吸附剂的等温吸附曲线

与第四章 4.3.2 节所报告的树脂填充 PES 纤维吸附剂等温吸附曲线相似, 如图 6.3.11 所示, 树脂填充 EVAL 纤维吸附剂等温吸附曲线较好地符合朗格缪尔吸

附模型。依据该模型计算得到的最大吸附容量 $q_{\max}$ 为 135mg BSA/(g 吸附剂)。

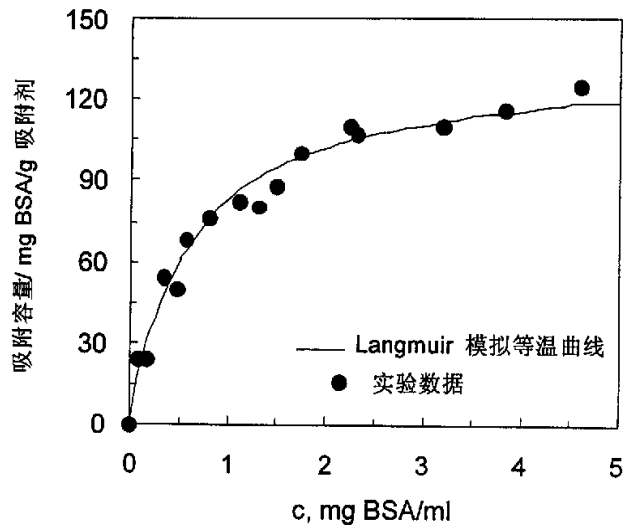


图 6.3.11 树脂填充 EVAL 纤维吸附剂等温吸附模拟曲线
(树脂 CNP80ws 填充量 65%，无外部液体使用)

6.3.4 树脂 CNP80ws 填充 EVAL 纤维吸附剂与其它类型吸附剂的比较

与树脂 CNP80ws 填充 PES 纤维吸附剂相比，树脂 CNP80ws 填充 EVAL 纤维吸附剂具有以下特点：在制备方法及形态结构方面，外部液体的使用能起到调控相分离过程的作用，在纤维的外表面产生了开孔结构，树脂颗粒被均匀地包裹在纤维基体内。但由于两种基质聚合物的相分离速度差异，使树脂填充 PES 纤维表面孔的连通性更好一些，对蛋白质的传质阻力更小一点，表面结构对其吸附性能影响更大。在吸附与脱附性能方面，树脂填充量相同时树脂填充 PES 纤维吸附剂的吸附容量较大，但其脱附率比树脂 CNP80ws 填充 EVAL 纤维吸附剂低很多，这是多孔的 PES 纤维基体对蛋白质具有一定吸附作用的缘故，而这种吸附是难以完全脱附与再生的。在纤维强度方面，树脂填充 PES 纤维吸附剂强度较高，其纤维直径可以做到较细，但树脂粉末的粒径限制了纤维直径进一步缩小。各种吸附剂的具体吸附容量列于表 6.3.1。

表 6.3.1 树脂 CNP80ws 填充 EVAL 纤维吸附剂与其他吸附剂的比较

吸附剂类型	树脂 填充 量/%	吸附容量/ (mg BSA/g 吸附剂)			脱附率/%		
		无外部液体	DEGMEE	丙酮	无外部液体	DEGMEE	丙酮
树脂/EVAL 纤维	50	53.9	54.8	54.4	88.9	90.6	93.6
	65	66	69.1	69.9	97	97.3	94.5
树脂/PES 纤维	50	53.5	68.2	78.5	56.5	65.8	65.5
树脂/EVAL 平板膜	50	76.2			95.3		
树脂/EVAL 平板膜 ^[1]	25	30					
	65	85					
	75	95					
树脂 CNP80ws		110					

由于吸附剂的形状与基体的形态结构不同,树脂填充 EVAL 纤维吸附剂与树脂填充 EVAL 膜吸附剂相比,二者吸附性能有些差异。在吸附剂形状方面,本研究制备的用于参照比较的膜吸附剂是平板式,试验用膜厚度约 0.2mm,纤维吸附剂是纤维状,其直径为 0.7~1.0mm;在制备方法 & 吸附剂的形态结构方面,膜吸附剂正反两面结构是不同的,如图 6.3.12 所示,膜表面的空气侧较为致密,膜的另一面则具有较大的开孔结构。膜的横断面结构 SEM 结果表明,树脂微粒与聚合物明显分相,EVAL 聚合物构成了连续相网络,而树脂颗粒较为自由地分散在聚合物基体内。在制膜过程中,铸膜液中溶剂只能从膜的空气侧与非溶剂进行交换,EVAL 铸膜液相分离速率较慢,形成了具有图 6.3.12 所示形态结构的膜吸附剂。对于树脂填充 EVAL 纤维吸附剂,纺丝液中溶剂只能从纺丝细流的外表面与非溶剂进行交换,尽管我们使用了外部液体调控纤维的外表面结构,但外表面开孔度与膜吸附剂反面相比仍较低。

图 6.3.13 和图 6.3.14 为树脂填充 EVAL 膜吸附剂的吸附与脱附性能。与 EVAL 纤维吸附剂相比,膜吸附剂的吸附容量较大,且在初始阶段吸附速率较快; 50%树脂填充量的 EVAL 膜吸附剂对 BSA 的吸附容量为 76.2 mg BSA/g 吸附剂,折合成树脂的吸附容量为 152.4 mg BSA/ (g 吸附剂),比纯树脂 CNP80ws 的吸附容量

约高出 40 mg BSA/(g 吸附剂),说明多孔 EVAL 基体可能吸附了一定量的 BSA。然而,文献报道纯 EVAL 膜对 BSA 的吸附容量很低^[1],这与树脂填充 PES 纤维吸附剂具有相似之处,因为纯 PES 超滤膜及纯 PES 纤维,当其表面较为致密时,对 BSA 的吸附容量也很低。与 EVAL 纤维吸附剂相似,EVAL 膜吸附剂的脱附率也较高(图 6.3.14)。除树脂与 BSA 复合体容易解离外,EVAL 基体与 BSA 复合体在洗脱液作用下也较容易解离,这表明膜吸附剂反面具有较大开孔度的开孔结构是造成上述结果的主要原因。

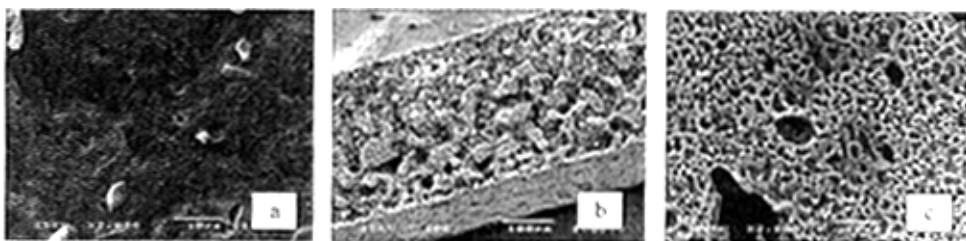


图 6.3.12 树脂填充 EVAL 膜吸附剂的 SEM 照片(树脂 CNP80ws 填充量 50%):

a-空气侧表面, b-横断面, c-玻璃侧表面

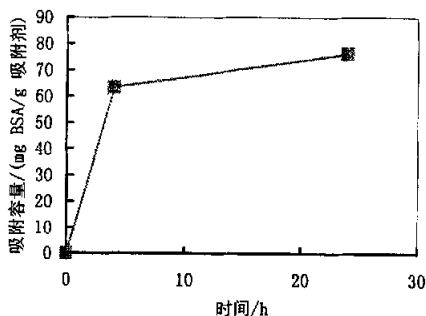


图 6.3.13 树脂 CNP80ws 填充 EVAL 膜吸附剂的吸附容量(树脂 CNP80ws 填充量 50%)

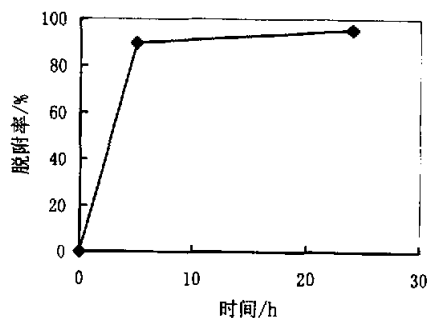


图 6.3.14 树脂 CNP80ws 填充 EVAL 膜吸附剂的脱附率(树脂 CNP80ws 填充量 50%)

6.4 本章小结

采用外部液体如 DEGME 和丙酮等调控纺丝细流外表皮的相分离过程,能够制备具有粗糙且开孔结构的树脂填充 EVAL 纤维吸附剂。由于 EVAL-DMSO-辛醇-树脂体系纺丝液在水中的相分离速度较慢,使得吸附剂表皮的开孔度相对较低。

树脂填充 EVAL 纤维吸附剂的吸附容量低于相同树脂填充量的 PES 纤维吸附剂和 EVAL 膜吸附剂。树脂填充 EVAL 纤维的脱附率较高，并远大于树脂填充 PES 纤维吸附剂的脱附率，这意味着树脂和 EVAL 对蛋白质 BSA 的吸附具有可逆性，有利于提高目标物的回收率。因此，以 EVAL 为基质材料的树脂填充纤维吸附剂有必要进一步研究开发，应进一步调整纤维吸附剂的形态结构特别是表面结构并且改善纤维吸附剂的机械强度。

6.5 参考文献

- [1] M. Avramescu Membrane adsorbers development and applications PhD thesis, University of Twente (2002)
- [2] T. Okaya, K. Ikari, C.A. Finch (Ed.), Wiley, New York, 1992.
- [3] Y. Sakurada, A. Sueoka, M. Kawahashi, Polym., J., 19 (1987) 501.
- [4] D.T. Lin, L.P. Cheng, L.W. Chen, T.H. Young, J. Membrane Sci. , 140 (1998) 185.
- [5] Y. Sakurada, A. Sueka, M. Kawahashi, Polymer Journal , , 19 (1987)501~513

第七章 改性聚乙烯醇亲水性多孔膜的制备与表征

摘要

由于亲水性聚合物对蛋白质的吸附较弱, 研究开发亲水性纤维或膜介质对纤维色谱及膜色谱的发展是重要的。本研究采用羟基保护的方法, 对聚乙烯醇进行部分缩乙醛化改性, 然后, 以所得聚乙烯醇缩乙醛为制膜材料, 采用相转化法制备超滤膜, 最后, 在酸性条件下, 一步完成对膜的脱乙醛和戊二醛交联, 从而达到既增加膜的强度, 又保持膜亲水性的目的。本文考察了聚乙烯醇缩乙醛浓度、铸膜液温度、凝固浴温度和盐含量以及添加剂含量等对膜纯水通量和截留率的影响, 研究了膜的形态结构、膜的亲水性以及膜耐污染性能。研究表明, 改性聚乙烯醇膜具有较小的接触角、良好的亲水性以及较好的耐污染性能。

7.1 概述

如前所述, 作为色谱用聚合物基质材料, 它应避免对蛋白质等溶质的非特异性吸附。按照一般的吸附原理, 亲水性聚合物对蛋白质吸附较弱。显然, 研究开发亲水性纤维或膜介质对纤维色谱及膜色谱的发展是重要的。

在第四章我们讨论了 PES 纤维对蛋白质的吸附特性。结果表明, 纤维基体的形态结构和表面结构对蛋白质吸附具有较大影响。由于这种吸附是基于蛋白质与 PES 纤维基体之间疏水作用, 容易造成蛋白质变性, 所以这种吸附是难以完全脱附的, 即使用酸性再生剂也难以完全使吸附点再生而达到完全活化的目的。

在第六章我们讨论了以 EVAL 为基体的树脂杂化纤维吸附剂的结构与性能, 结果表明, 该类吸附剂具有较好的脱附性能, 但其表面开孔度还不理想, 其制造工艺有待进一步完善, 纤维强度还需进一步提高。

在亲水性材料中, 聚乙烯醇 (PVA) 是一种无毒、带有大量可活化修饰的基团, 可以用做亲合色谱基质材料。由于 PVA 高度亲水性、化学性质稳定、机械强度高, 所以我们选择 PVA 为纤维色谱介质的基质材料。

本研究目的是为纤维色谱提供一种亲水的、带有活化基团的、稳定的、易于

成纤或成膜的且用途广泛的多孔吸附基体。本章工作重点为改性 PVA 多孔膜的制备及其表征。

7.2 PVA 分离膜的研究进展

PVA 分离膜制备及其改性研究已有不少报道^[1, 2], 但大多用于反渗透 (RO)、复合超滤膜 (UF) 和渗透汽化等致密膜的研究。

李娜等^[3]分别以 PAN、PVDF、Nylon 等疏水多孔膜为基膜, 用动态浸渍法制备了具有 PVA 交联涂层的复合超滤膜, 从而提高了基膜的亲水性和耐污染性能。

Li 等用 2,4-甲苯二异氰酸酯对戊二醛交联后的 PVA 膜进行表面改性^[4], 得到的膜对于生物大分子分离具有良好的选择性。另外, Li 等又报道在再生纤维素膜上涂一层戊二醛交联的 PVA 凝胶层^[5], PVA 凝胶层提供了光滑的亲水性膜表面, 使蛋白质吸附减少到最小。由于凝胶层截留住蛋白质, 阻止蛋白质渗透进入纤维素膜孔内, 防止了基膜的污染。

由于 PVA 分子间存在氢键, 又具有严格的线型结构, 在玻璃化温度以上 PVA 容易结晶。Amanda 等对半结晶的 PVA 进行热处理, 得到的膜具有较高的选择渗透性, 膜强度明显提高^[6]。

对不完全交联的 PVA 再进行自由基交联反应, 得到了三元 PVA 交联结构超滤膜 (UF)^[7], 所得到的膜具有亲水性, 吸水后的尺寸稳定性好, 截留分子量为 50,000, 膜纯水通量为 $1000\sim 1500\text{ l/m}^2\cdot\text{h}\cdot\text{kg/cm}$, 可用于蛋白质水溶液的脱盐、分离、浓缩和废水处理。

土原 洋治等采用 PVA 与疏水性聚丙烯腈 (PAN) 共混方法制备亲水性 UF 膜^[8]。当 PVA 和 PAN 的摩尔比为 5:1 时, UF 膜具有较好水通量及良好的溶质分离性能。

由于 PVA 亲水性强, 用相转化法难以直接制备超滤膜。本研究采用羟基保护的原理, 对 PVA 大分子链上羟基进行部分保护, 减少其与水的亲合性, 使相转化法制备超滤膜成为可能, 成膜后再对膜进行水解交联处理, 这样既能增加膜强度, 又保持了膜的亲水性。

PVA 羟基保护可用甲醛、乙醛或丁醛等对 PVA 进行缩醛化。缩醛度较低时, 制备的膜水溶胀度较大, 膜强度较低; 而缩醛度较大时, 膜的湿态强度较好, 但

膜亲水性较低。由于 PVA 缩甲醛和 PVA 缩丁醛水解温度高于其变形温度, 不能对膜直接进行水解交联处理。聚乙烯醇缩乙醛水解温度适中, 在室温或稍高温度下即可进行, 而且它的变形温度较高, 可对其进行边水解边用戊二醛交联处理。

总之, PVA 材料具有价格低、易得、耐污染、亲水性好、机械强度较高等特点, 对其适当改性可以制备出性能优良的多孔膜。

7.3 实验部分

7.3.1 原材料

表 7.3.1 原材料

原料	级别	生产厂家
聚乙烯醇(PVA) (n=1799)	工业品	天津乐泰化工有限公司
聚乙二醇 600 (PEG600)	分析纯	进口分装
乙醛水溶液 (40%)	分析纯	上海试剂一厂
N, N—二甲基乙酰胺(DMAc)	分析纯	天津试剂二厂
盐酸	分析纯	天津市耀华化工厂
硫酸钠	分析纯	天津市北辰骅跃试剂厂
戊二醛	分析纯	武汉有机合成化工厂
浓硫酸	分析纯	天津市化学试剂五厂
氢氧化钠	分析纯	天津市化学试剂三厂
二甲基亚砷 (DMSO)	分析纯	沈阳化学试剂厂
酚酞试剂		自制

7.3.2 聚乙烯醇缩乙醛的制备及结构表征

7.3.2.1 聚乙烯醇缩乙醛的制备

三口瓶之中加入 PVA 颗粒 70g、水 805g, 加热、溶解, 完全溶解后降温至 15℃以下, 加入 2%盐酸和过量 40%乙醛溶液进行缩醛化反应。把生成的白色沉淀物用超滤水洗涤, 在 60℃下干燥, 得到白色或浅黄色粒状固体聚乙烯醇缩乙醛。控制反应温度和反应时间, 可得到不同缩醛度的聚乙烯醇缩乙醛产物, 如表 7.3.2 所示。

表 7.3.2 不同缩醛度聚乙烯醇缩乙醛的制备条件

缩醛度 (%mol)	反应条件			
	40%乙醛/ml	反应时间/小时		
		15℃	25℃	50-60℃
49.4	100	1.0	0.5	1.0
52.2	100	1.5	0.5	1.0
54.8	100	2.0	0.5	1.0
57.0	130	1.0	0.5	1.0

7.3.2.2 聚乙烯醇缩乙醛的结构

用傅立叶变换红外光谱仪 (Perkin-Elmer Paragon1000) 测定聚乙烯醇缩乙醛的结构, 如图 7.3.1 所示。

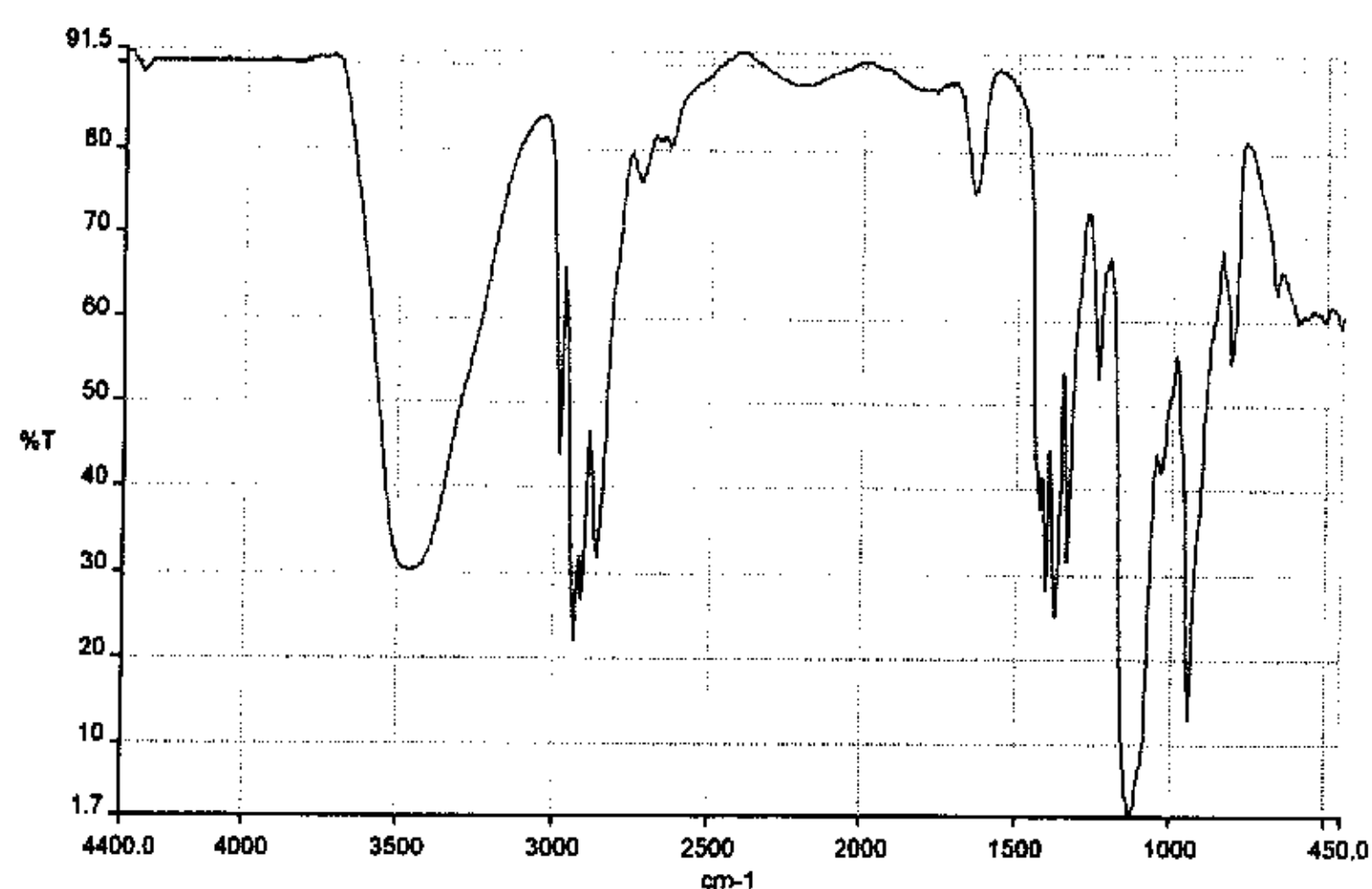


图 7.3.1 聚乙烯醇缩乙醛红外谱图

从红外谱图可以看出, 1244cm^{-1} 处有明显的吸收峰, 此峰为聚乙烯醇缩乙醛分子链上同碳双醚缩醛结构中 C-O 醚键的吸收峰, 由于其中一个 C-O 醚键受到另外一醚键上氧原子的吸电子作用的影响, 所以其吸收峰从 1100cm^{-1} 附近左移, 出现在 1244cm^{-1} 处。谱图中 1133cm^{-1} 处很强的吸收峰则是羟基上 C-O 键和分子链上 C-O-C 单醚键的吸收峰。由此可见, PVA 分子侧基上羟基通过缩乙醛化而得到了保护。

7.3.3 聚乙烯醇缩乙醛膜的制备

以 N,N-二甲基乙酰胺(DMAc)为溶剂, 制备由聚乙烯醇缩乙醛与添加剂聚乙二醇 600 组成的铸膜液, 过滤除去颗粒等杂质后, 恒温 70℃静置脱泡 24hr; 在玻璃板上刮膜后, 立即浸入凝固浴中沉淀成膜, 半小时后, 将膜浸入戊二醛交联液中进行水解、交联处理。

7.3.4 聚乙烯醇缩乙醛的缩醛度测定^[9]

称取 0.5-1.0g 聚乙烯醇缩乙醛试样放入 200ml 耐压瓶中, 加入 20.0ml 0.5mol/l 盐酸和 50 ml 约 1mol/l 盐酸羟胺溶液, 塞好瓶口, 在 60℃烘箱中加热至溶液澄清(4-5h), 必要时小心旋摇。冷却后, 以溴酚蓝作指示剂, 用 0.2mol/l 氢氧化钠回滴, 同时做一空白实验。缩醛度的计算如下:

$$\text{聚乙烯醇缩乙醛}(\%) = [(V - V_0) * C / 1000m] * 100 \quad (1)$$

式中 V-滴定试样所需氢氧化钠标准溶液的体积(ml), V_0 -滴定空白所需氢氧化钠标准溶液的体积(ml), C-氢氧化钠标准溶液的浓度(mol/l), m-试样质量(g)

7.3.5 膜性能表征

7.3.5.1 纯水通量测定

试验采用自制的超滤膜评价仪测定膜的超滤性能。取一张待测膜, 选择无缺陷部分剪下一片置于平板测试池上, 压好后, 调节压力到 0.06Mpa, 维持水温在 30℃, 测定膜的纯水通量, 单位为 l/m²h。

7.3.5.2 截留率测定

以分子量 67000 的牛血清白蛋白(BSA)为溶质, 用 pH=7.4 缓冲溶液配置 0.1% BSA 溶液, 溶液温度为 25℃, 收集原液和与之相对应的超滤液, 然后用 751G 紫外分光光度计(上海分析仪器厂)测定原液与超滤液的浓度。截留率计算公式为:

$$R(\%) = [(C_{\text{原}} - C_{\text{超}}) / C_{\text{原}}] * 100 \quad (2)$$

式中 $C_{\text{原}}$ 为原液 BSA 浓度, $C_{\text{超}}$ 为超滤液 BSA 浓度

7.3.5.3 接触角测定 (θ)

接触角测定采用直接测量的方法, 首先, 将准备好的膜平铺在 JY-82 型接触角测定仪(承德试验机厂)的载物平台上压平, 然后用注射器滴一滴蒸馏水于膜的表面。调节基线与膜的表面成一条线, 使“0”在液滴的三相接触点上, 然后转动测定仪, 读取切线与相界面的夹角 θ 。

7.3.5.4 形态结构观测

膜的形态结构用 KYKY-2800 型 SEM 观测。样品的制备同第三章所述。

7.3.5.5 孔隙率和平均孔径的测定

取一定面积 (A) 的湿态膜, 用滤纸吸掉膜表面水后, 称重 W_1 , 用螺旋测微器测定平均厚度 l , 移入真空烘箱至恒重 W_2 , 孔隙率 ρ_r , 计算公式为:

$$\rho_r = (W_1 - W_2) / (A \cdot l \cdot \text{dm}) \quad (3)$$

式中 W_1 -湿膜重, W_2 -干膜重, l -膜的厚度, A -膜面积, dm -水密度。

采用流速法, 利用叶凌碧提出的修正式计算平均孔径^[10]:

$$r_r = [(2.9 - 1.75 \rho_r) * 81 \eta J / (p_r \cdot \Delta p)]^{1/2} \quad (4)$$

式中 r_r -膜的平均孔径, ρ_r -膜孔隙率, l -膜厚度, η -水粘度, J -单位面积膜的纯水通量, Δp : 跨膜压差

7.3.5.6 膜的耐污染试验

用 BSA 溶液测试膜截留率后, 由于部分蛋白被吸附在膜表面或膜孔内, 致使膜的水通量下降。把测试后的膜在纯净水中浸泡两天后, 用纯净水冲洗数次, 再测试膜的纯水通量 (J), 由式 (5) 计算纯水通量恢复率。

$$\text{纯水通量恢复率 (\%)} = (J/J_0) \times 100 \quad (5)$$

式中 J_0 为测截留率前膜的初始纯水通量。

7.4 结果与讨论

7.4.1 聚乙烯醇缩乙醛改性膜的形态结构

如图 7.4.1 和图 7.4.2 所示, 聚乙烯醇缩乙醛改性膜的正面是较为致密的, 反面为开孔结构。铸膜液中聚合物和添加剂配比不同以及成膜条件差异将会影响膜的结构。铸膜液中聚乙烯醇缩乙醛和 PEG600 配比为 1: 1 时, 膜横断面是指状孔结构 (见图 7.4.1b), 而当该配比为 1: 1.5 时膜横断面则呈现海绵层结构 (见图 7.4.2b)。

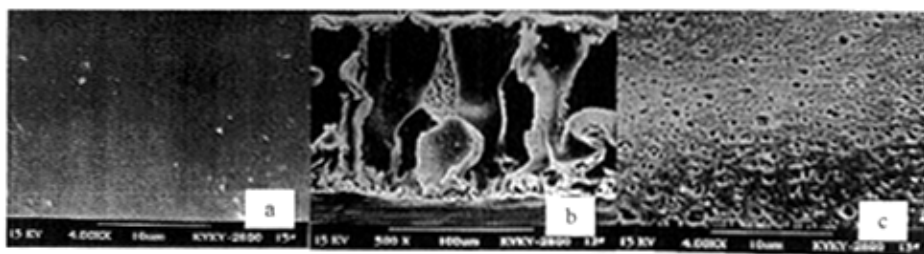


图 7.4.1 聚乙烯醇缩乙醛改性膜的 SEM 照片 (铸膜液中聚合物和添加剂 PEG600 的配比是 1: 1): a-空气侧正面, b-横断面, c-玻璃板反面

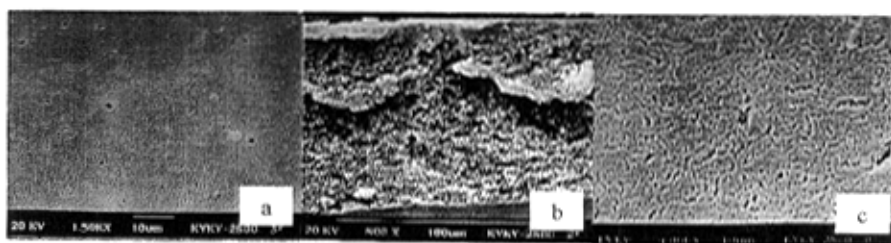


图 7.4.2 聚乙烯醇缩乙醛改性膜 SEM 照片 (铸膜液中聚合物和添加剂 PEG600 的配比为 1: 1.5): a-空气侧正面, b-横断面, c-玻璃板反面

7.4.2 铸膜液组成和制膜工艺参数对膜性能的影响

7.4.2.1 铸膜液中聚乙烯醇缩乙醛浓度对膜性能的影响

当铸膜液固含量较高时, 膜孔隙率较低, 截留性能较好。但是, 过高的固含量会造成透水量偏低, 同时, 由于铸膜液脱泡困难, 制备的膜易产生欠缺、斑点。当铸膜液固含量较低时, 成膜后膜强度低, 膜内易产生大空腔。当凝固液温度为 30℃ 时, 铸膜液中聚乙烯醇缩乙醛固含量 8%~10% 较为合适。

从图 7.4.3 可以看出, 添加剂 PEG 含量一定时, 随聚乙烯醇缩乙醛浓度增加,

膜的纯水通量降低。增加铸膜液中聚合物浓度，在相分离界面聚合物浓度较高，在凝固浴中发生瞬时分相时，表面形成较多的聚合物聚集体胶束，造成膜的平均孔径与孔隙率降低，导致膜纯水通量下降。

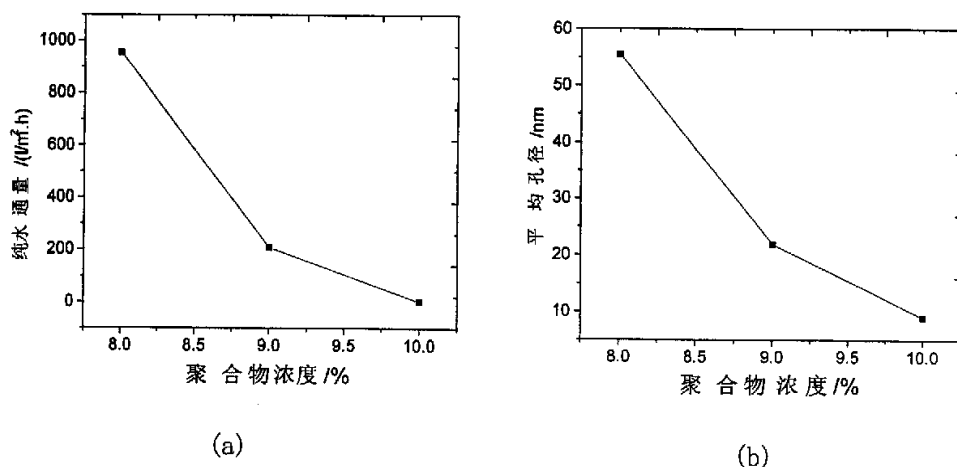


图 7.4.3 膜纯水通量与平均孔径随聚乙烯醇缩乙醛浓度的变化 ($T_w=45^{\circ}\text{C}$; 缩醛度=54.8%; $T_a=30^{\circ}\text{C}$): a-纯水通量; b-平均孔径

7.4.2.2 添加剂 PEG600 含量对膜纯水通量的影响

聚乙二醇 (PEG) 是一种常用的有机物添加剂，它主要依靠调节铸膜液中聚合物状态而影响膜结构。对于聚乙烯醇缩乙醛-PEG-DMAc 组成的三元铸膜液体系，聚乙二醇分子中羟基 ($-\text{OH}$) 与溶剂分子发生氢键作用而产生缔合，改变了聚乙烯醇缩乙醛分子附近溶剂作用。从图 7.4.4 中可以看到，聚合物浓度一定时，随着 PEG600 含量增加，膜的纯水通量呈现增加趋势，增加到一定数值后，纯水通量又减小；而且随 PEG 含量增加，膜结构也发生了变化（如图 7.4.1b 和图 7.4.2b 所示），其横断面由指状孔变为疏松的海绵层结构。由于溶剂 DMAc 与凝固剂水之间相互扩散速率大于 PEG600 迁移速率，因而添加 PEG 能抑制指状孔的产生，提高膜孔之间连通性与膜的孔隙率。但随添加剂含量继续增加，高聚物与溶剂作用减弱，铸膜液粘度增大，易形成较为致密的表面层，膜纯水通量又降低。可见，添加剂含量对控制膜的性能是很重要的。

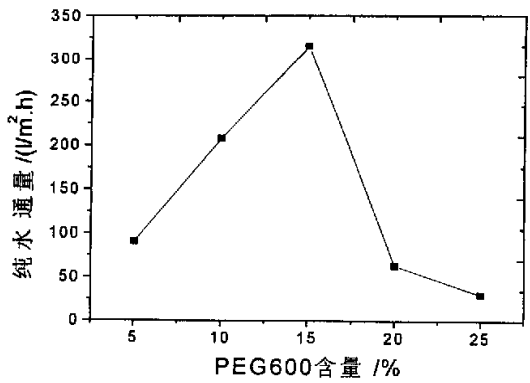


图 7.4.4 添加剂 PEG600 含量对膜纯水通量的影响

($T_{\text{膜}}=45^{\circ}\text{C}$; 聚乙烯醇缩乙醛浓度 8%; 缩醛度=54.8%)

7.4.2.3 缩醛度对膜性能的影响

不同缩醛度的聚乙烯醇缩乙醛制成膜后，缩醛度对膜性能有较大的影响，如图 7.4.5 和表 7.4.1 所示。从图 7.4.5 可以看出，膜纯水通量随聚乙烯醇缩醛度的增加呈增大趋势。因为缩醛度较小的 PVA 与凝固浴中溶剂亲和力较大，降低了膜浸渍沉淀的速率，从而形成了表面较为致密的且具有较小平均孔径的多孔膜，导致膜的纯水通量较低。由于蛋白对膜的部分污染和测试误差，发现缩醛度与膜截留率之间没有规律性（表 7.4.1），但缩醛度为 49.3% 的膜截留率最小，可能是由于它的亲水性相对较好，测试过程中蛋白对它造成的污染较小所致。

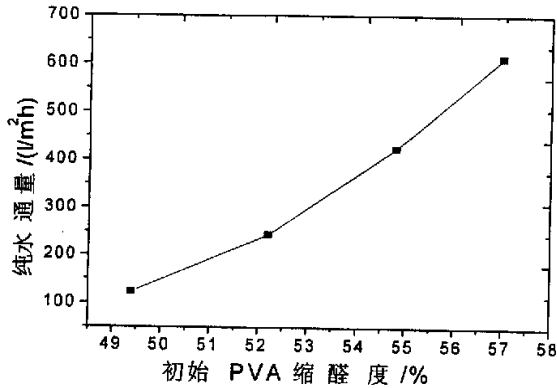


图 7.4.5 缩醛度对膜纯水通量的影响

表 7.4.1 缩醛度对膜截留率的影响

缩醛度/%	49.4	54.8	57.0
BSA 截留率/%	88.3	96.4	95.8

注：铸膜液配比：聚乙烯醇缩乙醛 12%，PEG600 10%；凝固浴为硫酸钠溶液，铸膜液温度为 60℃，凝固浴温度为 38℃。

7.4.2.4 凝固浴温度对膜纯水通量的影响

由图 7.4.6 得知，凝固浴温度升高，膜水通量增加。主要是因为凝固浴温度升高，促进了溶剂 DMAC 与非溶剂硫酸钠水溶液之间扩散，提高了扩散速率，因而成膜时瞬时相分离速率提高，导致了膜表面孔隙率增加，平均孔径变大，膜纯水通量增大。从膜结构上也能看出，较低温度下制备的膜表面层（图 7.4.7a）比在较高温度下制备的膜表面层厚而致密（图 7.4.7b）。

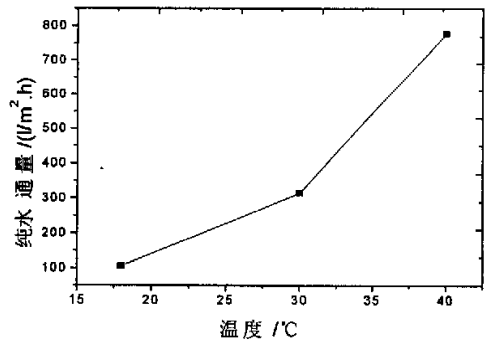


图 7.4.6 凝固浴温度对膜纯水通量的影响 ($T_w=45^{\circ}\text{C}$ ；缩醛度=57%)

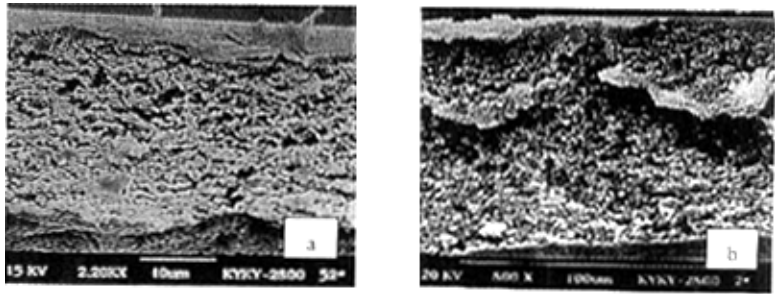


图 7.4.7 聚乙烯醇缩乙醛膜的横断面 SEM 照片：凝固浴温度：a-18℃；b-40℃

7.4.2.5 铸膜液温度对膜性能的影响

由图 7.4.8 和图 7.4.9 看出, 随铸膜液温度升高, 膜纯水通量增大, 对 BSA 的截留率也同时增大。因为铸膜液温度提高, 影响相分离时溶剂与沉淀剂的交换速率, 使得溶剂扩散系数变大, 向凝胶浴中迁移速率提高。膜表面皮层的孔结构与初生态膜的凝胶条件有关, 由于溶剂大量移出, 使初生态膜表面局部浓度变大, 最终形成较为致密表皮层, 平均孔径减小, 但同时随着铸膜液温度的提高, 铸膜液粘度下降, 膜的孔隙率增大。结果表现为超滤膜纯水通量增大, 对牛血清白蛋白的截留率也同时提高。

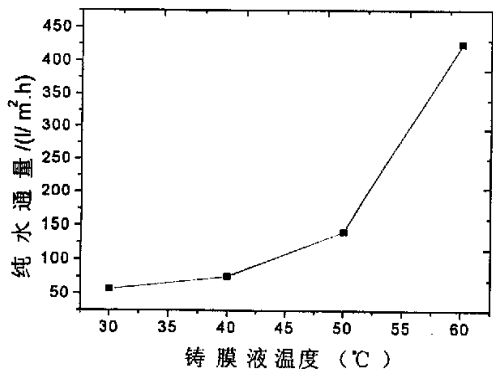


图 7.4.8 铸膜液温度对膜纯水通量的影响
(缩醛度为 49.3% ; 聚乙烯醇缩乙醛浓度为 12%)

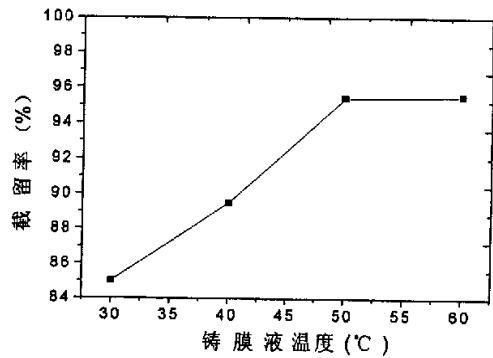


图 7.4.9 铸膜液温度对截留率的影响
(缩醛度为 49.3% ; 聚乙烯醇缩乙醛浓度为 12%)

7.4.2.6 凝固浴中无机盐及其含量对膜性能的影响

凝固浴中无机盐对膜有阻溶胀作用,但不同的盐组分其化学势有差异,对成膜沉淀速率影响也不同,从而影响膜的性能,结果如表 7.4.2 所示。氯化钠溶液的化学势较高,降低了铸膜液溶剂和凝固浴中非溶剂的交换速率,所得膜的纯水通量较低、平均孔径较小。硫酸钠溶液中加入少量氢氧化钠时,膜具有较高的纯水通量和较大的平均孔径,可能是氢氧化钠的加入增加了膜的沉淀速率的缘故。

表 7.4.2 凝固浴中无机盐组分对膜纯水通量和平均孔径的影响

盐 组 分	项 目	膜纯水通量/ (L/m ² ·h)	平均孔径/nm
氯化钠		9.4	7.3
硫酸钠		37.6	24.6
硫酸钠+氢氧化钠		179.2	95

凝固浴中盐组分含量对膜性能的影响如图 7.4.10 所示,凝固浴中硫酸钠含量增加,膜纯水通量增大。这是由于凝固浴中盐浓度增加,减小了聚合物与凝固浴的亲水性,加快了膜的沉淀速率和膜瞬时分相速率。

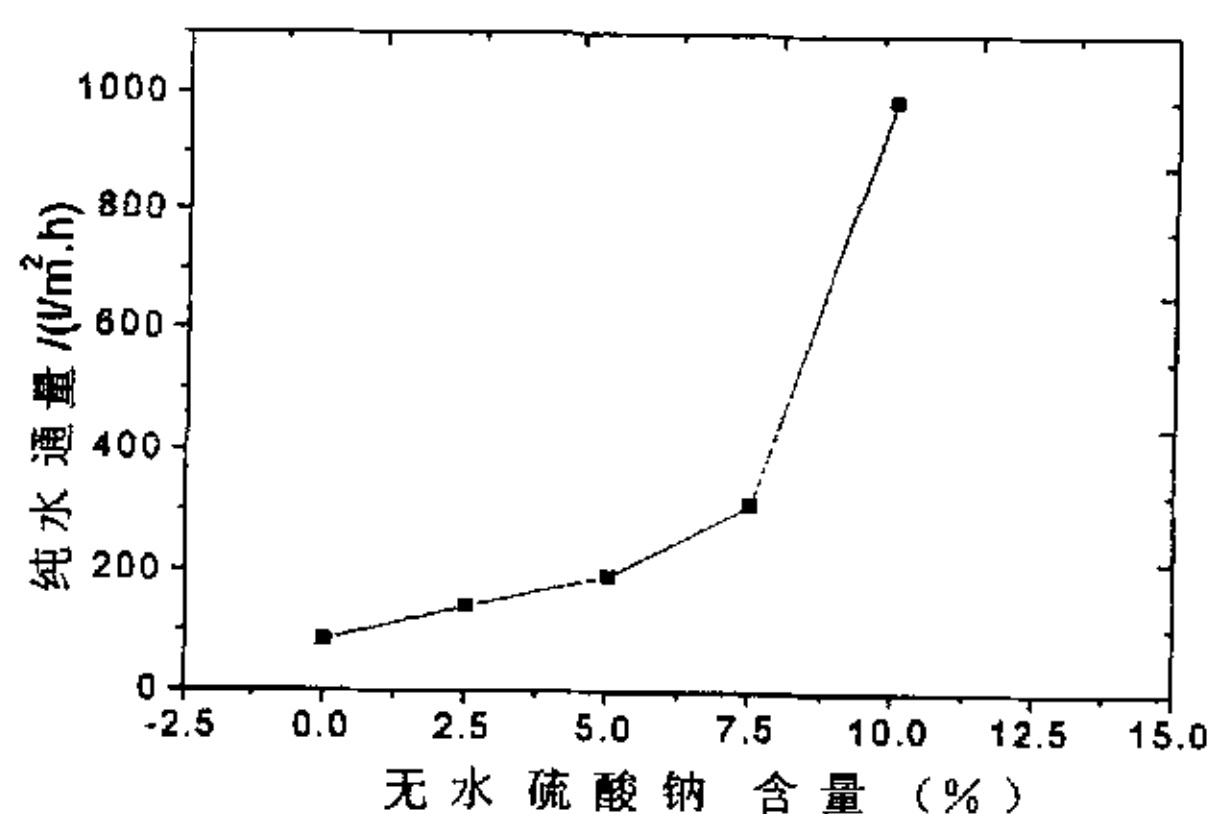


图 7.4.10 膜纯水通量随凝固浴中硫酸钠含量的变化

7.4.3 聚乙烯醇缩乙醛改性膜的亲水性研究

7.4.3.1 聚乙烯醇缩乙醛改性膜的接触角与亲水性

由于 PVA 材料具有强烈的亲水性,难以通过相分离法直接制备 PVA 多孔膜。

我们设想：首先，将 PVA 羟基保护降低其亲水性，以便制备出多孔膜，然后，使部分羟基还原，保持 PVA 较好的亲水性。通过测定膜表面接触角证实了该设想是可行的。

由于 PVA 缩醛膜分子中羟基数量大量减少，膜对水的亲和性明显下降，如表 7.4.3 所示。接触角由未交联 PVA 膜的 0° 增加到缩醛后的 40° 左右。改性后 PVA 的成膜性增强，可以在凝固浴水中成膜，得到的膜表面接触角较大。对膜进行羟基解保护同时用戊二醛进行交联处理后，膜表面接触角减小了 10° 左右，亲水性明显增强，膜强度也有所提高。

表 7.4.3 膜水解交联前后的接触角

缩醛 度/%	接触角/度		
	未交联 PVA 膜	水解交联前	水解交联后
49.4	0	38.58	24.58
52.2	0	42.33	35.75

由于水解和交联反应是在异相中进行，交联完成后会残留一部分缩醛。交联处理后膜的缩醛度见图 7.4.11。

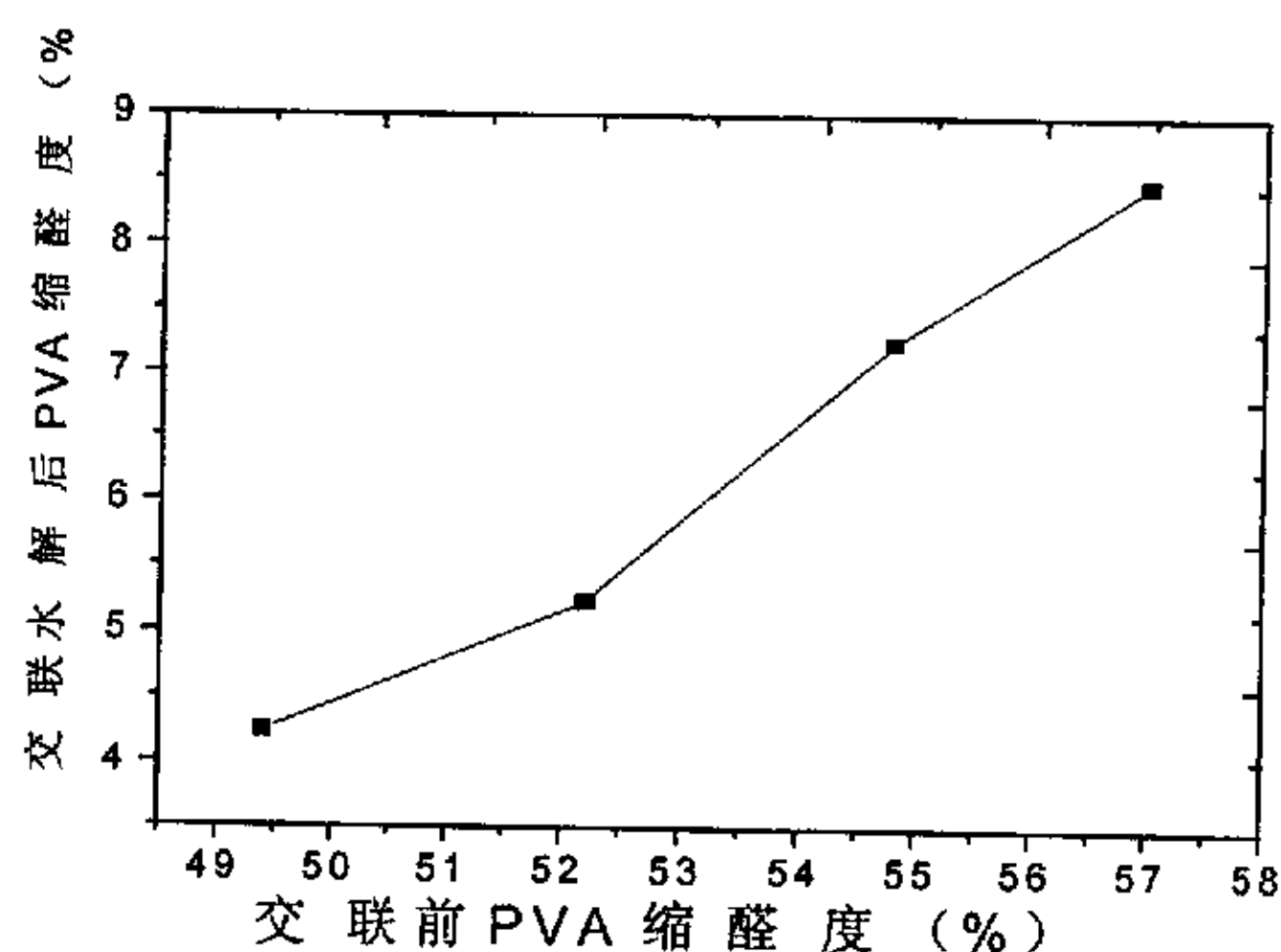


图 7.4.11 交联处理后膜的缩醛度

聚乙烯醇缩醛度越大，水解交联后膜残留的缩醛量越大，所以水解交联后膜表面接触角随初始聚乙烯醇缩醛度的增加而增大（图 7.4.12），说明膜的亲水性下降。

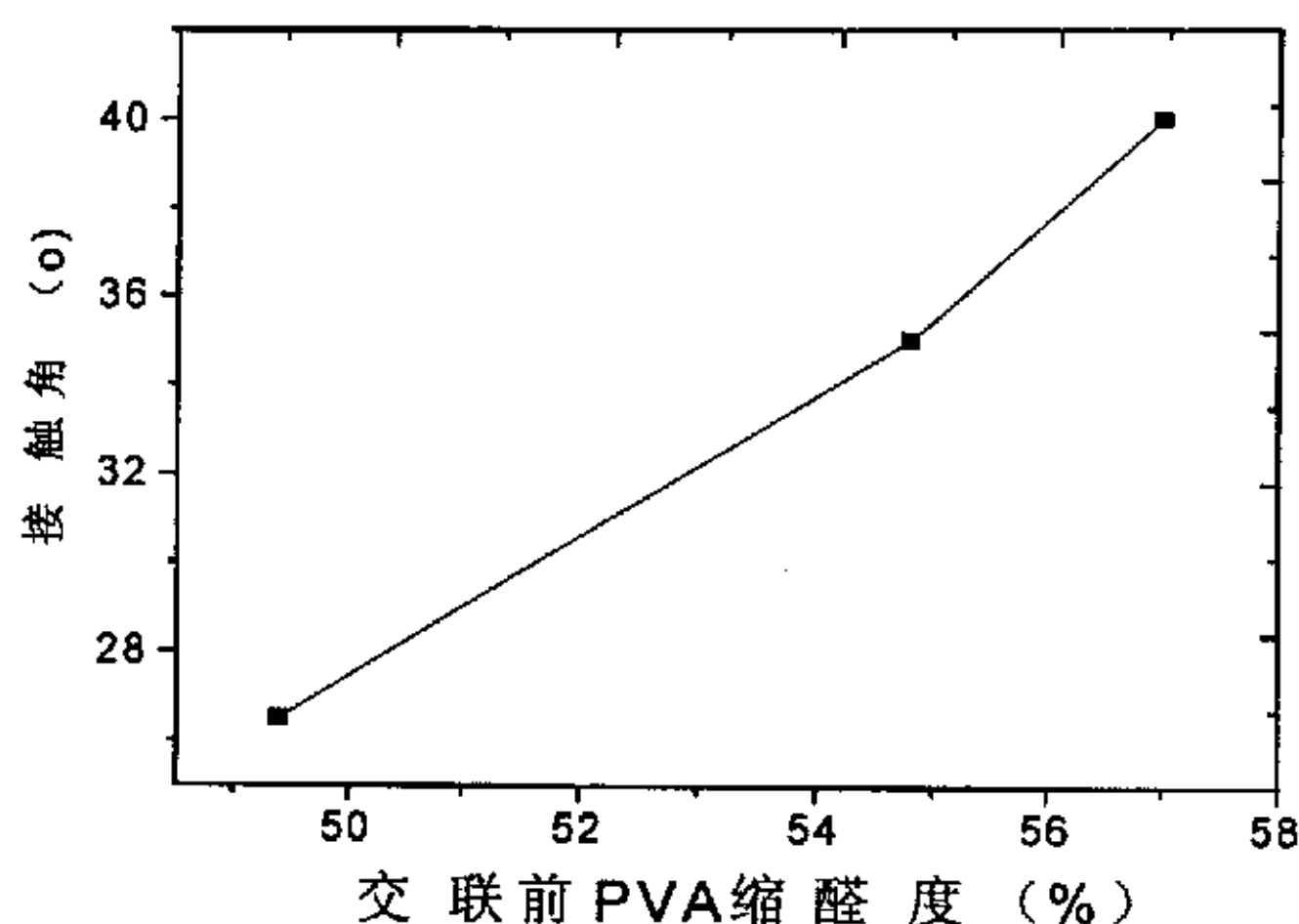


图 7.4.12 交联后膜接触角随交联前缩醛度的变化

一般情况下，疏水性超滤膜干燥后膜性能难以恢复。聚乙烯醇缩乙醛膜具有较好的亲水性，它的干膜性能恢复性如图 7.4.13 所示。在保持膜的强度同时，交联时间越长，膜干燥后其性能恢复的越差。交联时间短，膜的交联度较小，膜亲水性较好，所以它的干膜性能恢复率较高。因此，在保持一定膜强度条件下，选择适当的交联时间可以使膜具有较好的亲水性。

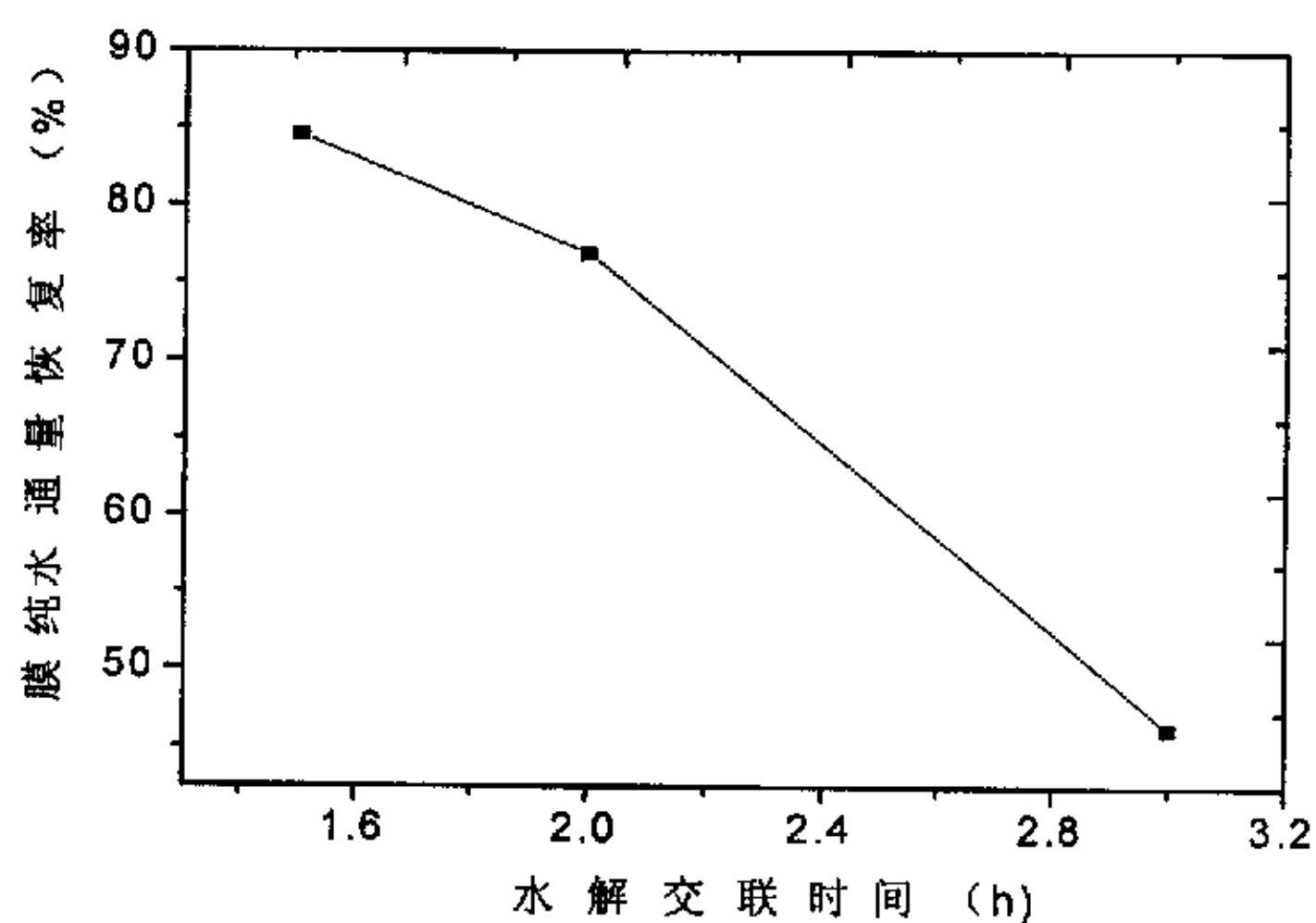


图 7.4.13 交联时间对干膜性能恢复的影响

7.4.3.2 聚乙烯醇缩乙醛膜抗蛋白污染的性能

PVA 缩醛度较低时，经过水解交联后聚合物链上缩醛含量也较少（见图 7.4.11），该 PVA 缩醛膜具有较好亲水性（图 7.4.12），它的耐蛋白污染性能也较好，水清洗后膜纯水通量恢复率达到 90%以上（表 7.4.5），而 PVA 缩醛度较高

时,水清洗后的膜纯水通量恢复率只有 66%左右。

表 7.4.5 膜清洗后纯水通量的恢复率

缩醛度 (%)	未污染膜初始纯水 通量/ (L/m ² .h)	污染膜清洗后纯水 通量/ (L/m ² .h)	恢复率/%
49.4	245.3	226.4	92.3
54.8	283.0	188.7	66.7
57.0	141.5	94.3	66.6

7.4.3.3 聚乙烯醇缩乙醛改性膜与其他膜的亲水性比较

纤维素和陶瓷都是开发较早的亲水性膜材料,其膜表面接触角明显小于其他材料,但由于纤维素耐生物降解能力差等原因,需要对其进行改性。从表 7.4.6 中可看到,聚乙烯醇缩乙醛改性膜具有较小的接触角,与纤维素相差不大,说明它的亲水性较好,达到了较理想的效果。

表 4.6 各种膜的接触角比较

膜	接触角 (度)	备注
缩醛改性聚乙烯醇	24.6	本实验制备
聚醚砜	56	
纤维素	24	
陶瓷	30	文献[11]
聚偏氟乙烯	66	
聚砜(PM10, Amicon)	38	

7.5 本章小结

以 PVA 为基本原料,采用乙醛对 PVA 进行羟基保护的方法,可调控制备一定缩醛度的聚乙烯醇缩乙醛,然后用相转化方法直接制备聚乙烯醇缩乙醛超滤膜,最后一步(乙醛水解和戊二醛交联同时进行)形成戊二醛交联 PVA 亲水性膜,该工艺简单易行。

改性 PVA 超滤膜具有较高的水通量,对 BSA 的截留率大于 90%。该膜具有较小的表面接触角、良好的亲水性以及较好的耐蛋白污染性能。

可以预期,改性 PVA 可为纤维色谱提供一种亲水的、带有活化基团的、易于

成膜或成纤的且用途广泛的多孔吸附介质。

7.6 参考文献

- [1] She Jian, Shen Xiaoming, Crosslinked PVA-PS thin-film composite membrane for RO. Desalination, 1987, 62: 395~403
- [2] Katz M.G., Wydevan T., Selective permeability of PVA membrane. Heat treated membranes J.App.Poly. Sci., 1982(27): 79~87
- [3] Na Li, Zhongzhou Liu, Dynamically formed poly(vinyl alcohol) ultrafiltration membranes with good anti-fouling characteristics, J.Membr.Sci., 169(2000), 17~28
- [4] R.H.Li and T.A. Barbari, Protein transport membrane based on toluene diisocyanate surface-modified poly(vinyl alcohol) gels, J.Membr.Sci., 88(1994), 115~125
- [5] R.H.Li and T.A. Barbari, Performance of poly(vinyl alcohol) thin-gel composite ultrafiltration membranes, J.Membr.Sci., 105(1995), 71~78
- [6] A. Amanda and A. Kulprathipanja, Semicrystalline poly(vinyl alcohol) ultrafiltration membrane for bioseparation, J.Membr.Sci., 176,(2000), 87~95
- [7] JP64,43309(1989)
- [8] 土原 洋治, 笠井 千春, 日本接着学会志, 126 (6) , 218~222(1990)
- [9] 董炎明, 高分子材料实用剖析技, 北京: 中国石化出版社 (1997)
- [10] 高以垣 叶凌碧等, 膜分离技术基础, 北京: 科学出版社 (1989)
- [11] M.cheryan., Ultrafiltration and Microfiltration Handbook, Pennsylvania: Technomic Publishing co.Inc., (1998)

第八章 全文总结

膜色谱作为一种有竞争力的分离方法在生物制品的分离纯化中应用显著增加。但是,应用膜吸附剂技术须对料液进行预处理,除去料液中的不溶性颗粒与类脂等物质,以防这些物质将膜污染,造成膜吸附剂性能下降。为此,本文提出了纤维色谱与纤维吸附剂的概念,期望能够克服膜色谱和颗粒填充色谱的缺点。本研究采用可控相转化法,量身定制了多种形态结构的树脂填充纤维吸附剂,并对其性能进行了表征。所得结果总结如下:

(1) 采用外部液体如 DEGMEE, TEEG, NMP/水及丙酮等改变了纤维成形过程中的聚合物溶液相分离路径,达到了调控纤维吸附剂表面形态结构的目的。通过可控相转化方法,以不同种类的阳离子交换树脂为功能颗粒,聚醚砜(PES)为纤维基质材料,制备了基体为多孔性的且表面具有开孔结构的树脂填充 PES 纤维吸附剂。树脂颗粒的种类与含量对纤维最终形态结构有较大的影响,较高树脂填充量有助于形成表皮具有开孔结构的纤维吸附剂。

(2) 对不同形态结构的树脂填充 PES 纤维吸附剂与模型蛋白质(牛血清蛋白)的吸附与脱附性能的研究表明,表皮具有开孔结构的树脂填充纤维吸附剂具有较好的吸附与脱附性能,具有这种结构的基体有利于蛋白质类溶质自由出入,所得树脂填充纤维吸附剂的吸附容量为 68.2~93.2 mg BSA/g 吸附剂(树脂填充量 50%),可与其它类型色谱介质相媲美。但由于吸附在多孔 PES 基体的蛋白质难以完全解离,树脂填充 PES 纤维吸附剂的脱附率较低。树脂填充纤维吸附剂等温吸附曲线表明了吸附剂的吸附过程符合朗格缪尔吸附模型。吸附动力学指出表皮具有开孔结构的树脂填充纤维吸附剂的吸附速率与纯树脂相当,吸附剂表皮的开孔结构对降低溶质的传质阻力有益。对于蛋白质在树脂填充纤维吸附剂中的传质过程,本文提出纤维吸附剂基体内的孔扩散与树脂内的孔扩散是速率控制步骤。树脂填充纤维吸附剂传质机理还有待进一步深入研究。

(3) 操作条件的优化选择对纤维吸附剂的实际应用具有重要的价值。当离子交换树脂填充 PES 纤维吸附剂用于蛋白质的分离时,诸如料液 pH、溶质浓度、洗脱剂的 pH 和离子强度、吸附剂的预处理和后处理、吸附剂再生以及料液流动状态等参数是影响其吸附与脱附性能的重要因素。

(4) 为降低聚合物基质材料对蛋白质的吸附, 本研究以 EVAL 为纤维基质材料, 制备了表皮具有开孔结构的树脂 CNP80ws 填充 EVAL 纤维吸附剂。所得树脂填充 EVAL 纤维吸附剂表皮的开孔度相对较低, 其吸附容量低于相同树脂填充量的 PES 纤维吸附剂和 EVAL 膜吸附剂, 但其脱附率较高, 远大于树脂填充 PES 纤维吸附剂的脱附率。由此可见, 树脂和 EVAL 基体对蛋白质 BSA 的吸附具有可逆性, 有利于提高目标物的回收率。以 EVAL 为基质材料的树脂填充纤维吸附剂还有必要进一步研究开发, 须进一步调整优化纤维吸附剂的形态结构特别是表面结构并改善吸附剂的机械强度。

(5) 本研究采用羟基保护的方法, 对 PVA 进行部分缩乙醛化改性, 降低 PVA 的亲水性, 利用相转化法成膜后, 在酸性条件下, 一步完成对膜的脱乙醛和戊二醛交联的后处理过程, 成功制备了聚乙烯醇缩乙醛超滤膜。该膜具有较高的纯水通量, 对牛血清蛋白 ($M_w=67000$) 的截留率大于 90%。与其他材料相比, 改性 PVA 多孔膜具有较小的表面接触角、良好的亲水性以及较好的耐蛋白污染性能。可以期望, 它能为纤维色谱或膜色谱提供一种亲水的、带有活化基团的、稳定的、易于成膜或成纤的且用途广泛的多孔吸附介质。今后工作应以改性 PVA 为基质材料, 尝试制备性能较好的树脂填充纤维吸附剂。

综上所述, 阳离子交换树脂填充纤维吸附剂是一种新型的离子交换色谱介质, 尚未见报道。纤维色谱是在膜色谱基础上提出来的, 是为了解决膜色谱在操作过程中较易被污染的问题, 但纤维色谱在作用机理上更接近于颗粒填充色谱。因此, 在制备纤维吸附剂时, 我们借鉴了膜色谱介质的制备方法、纤维的制备方法以及多孔膜的制备方法, 以便制备出传质阻力较低的纤维吸附剂。颗粒填充纤维吸附剂提供一个进行新型色谱研究与技术开发的平台, 可以采用任何种类和尺寸的功能颗粒与任意聚合物杂化构成具有各种功能的纤维吸附剂。这种方法对纤维吸附剂的结构与性能容易实施调控, 使我们能在温和的条件下制备纤维色谱介质, 并且在制备过程中不影响功能物质的活性与完整性, 更适合于热敏性功能物质颗粒。纤维吸附剂的吸附与脱附实验结果表明, 该类吸附剂对模型蛋白质 BSA 的吸附容量较大且脱附率较高, 并与膜吸附剂相媲美。因此, 可以确认基体为多孔性的且表皮具有开孔结构的树脂填充纤维吸附剂作为纤维色谱介质是可行而有效的。

致谢

非常感谢尊敬的导师肖长发教授,在您亲切关怀和悉心指导下,顺利地完成了博士论文的工作。导师广博深厚的理论素养、严谨求实的治学态度和精益求精的工作作风将使我终身受益。在此对导师的培养和关怀致以衷心的感谢和崇高的敬意!

感谢荷兰屯特大学 M. Wessling 教授及他领导的欧洲膜研究所为进行本论文课题的研究给我提供的所有帮助。感谢 Z. Borneman 先生给予的指导与工作生活中的各种帮助,感谢与 M. Wessling 教授进行的有益探讨。感谢在此实验室工作时各位同事给予的帮助与支持。

感谢天津工业大学膜科学与技术研究所的同事李然、李泓、韩素英、杜启云教授以及其他老师给我的关怀与帮助。

感谢天津工业大学给我传授科学知识的所有老师,感谢研究生部各位老师的辛勤工作与热情的帮助,感谢天津工业大学各级组织对我的关心与支持。。

感谢我的学生李慧琴等参与我的第六章工作。感谢高淑琴老师为我论文的装订与打印提供的支持。

最后,衷心感谢我的家人特别是我的夫人陈伟华与我的女儿张一琛对我的博士论文工作的支持与理解。当我在工作中遇到困难与挑战,当我在国外感到非常孤独的时候,是你们给了我圆满完成博士论文工作的决心与信心。

我愿将我的博士文献给我的夫人和我的女儿,献给所有帮助过我的同志。

张玉忠

2003-12-26

个人简历

姓名：张玉忠 性别：男 生日：1963-10-9 籍贯：河北省 沧州

教育及工作经历

- ◆ 1980-1984 河北大学化学系 大学本科
- ◆ 1984-1987 中国科学院长春应用化学研究所 理学硕士
- ◆ 2000-2003 天津工业大学 在职博士
- ◆ 1987-至今 天津工业大学膜分离研究所
- ◆ 2002.6-2003.6 荷兰屯特大学 (Twente University) 进修

研究工作范围

- ◇ 渗透气化膜及过程
- ◇ 中空纤维超滤膜及过程
- ◇ 亲和膜分离
- ◇ 生物分离技术
- ◇ 膜技术开发及其应用

发表的论文与著作

- 张玉忠、郑领英、高从阶， 液体分离膜技术及其应用， 北京：化学工业出版社（2003）
- 李然、张玉忠、李泓、肖长发， 膜法处理退浆废水，水处理技术，2003，29（1）：50-52
- Zhang Yuzhong, Li Ran, & Li Hong, The treatment of desizing wastewater with UF/NF hybrid technology, 2001 International conference on the application of membrane technology, shanghai, 2001
- Zhang Yuzhong, Li Ran, Li Hong, & Xiao Changfa, The treatment of desizing wastewater with membrane technology, Critical Technologies to the world in 21st century, Beijing, sep. 2000
- 李勇胜，史林启，张玉忠，乳化液膜清除分离胆红素的研究 离子交换与吸附，2000，16（6），508-513（EI 收录）

- 张玉忠 肖长发, 膜色谱技术进展, 天津工业大学学报, 已接收, 待发表(论文第二章)
- Yuzhong Zhang, Zandrie Borneman, Geert-Henk Koops, Matthias Wessling, Preparation of resin mixed fibrous adsorbers and its adsorption performances with protein, 投至: J. membrane sci.(论文第三章)
- Yuzhong Zhang, Zandrie Borneman, Geert-Henk Koops, Matthias Wessling, The behavior of adsorption and desorption of bovine serum albumin with resin mixed fibrous adsorbers, 投至: J. chromatography A(论文第四章)
- Zandrie Borneman, Yuzhong Zhang, Geert-Henk Koops, Matthias Wessling, Effect of operation parameters on the behavior of adsorption and desorption of bovine serum albumin with resin mixed fibrous adsorbers, 投至: J. chromatography B(论文第五章)
- 张玉忠 李然 李泓 肖长发 Zandrie Borneman, Geert-Henk Koops, Matthias Wessling, 阳离子交换树脂杂化 EVAL 纤维吸附剂的研究, 离子交换与吸附, 已接收, 待发表(论文第六章)
- Yuzhong Zhang, Huiqing Li, Hong Li, Changfa Xiao, Preparation of modified PVA ultrafiltration membrane, 投至: J. membrane sci.(论文第七章)

天津工业大学

研究生学位论文附件(随论文附)

姓名 张玉忠	学位层次 博士	专业 纺织工程	导师 肖长发
论文题目: 树脂填充纤维吸附剂的研究			
论文新观点、新内容、新方法及创新点有哪些? 在国内、外处于何水平? 有何实际指导意义? 论文采用可控相转化法, 制备了多种类型离子交换树脂填充纤维吸附剂, 并对其结构与性能进行了较为全面、系统的研究, 取得了下列创造性成果: (1) 为了克服膜色谱及颗粒填充色谱的缺点, 在国际上首先提出了纤维吸附剂和纤维色谱的概念。成功制备了离子交换树脂与聚合物基质材料杂化而成的多种纤维吸附剂, 如树脂 CNP80ws 填充 PES 纤维吸附剂、树脂 SP112ws 填充 PES 纤维吸附剂、树脂 CNP80ws 填充 EVAL 纤维吸附剂等。这些纤维吸附剂均具有较高的蛋白质吸附容量, 作为色谱介质是可行而有效的。这为纤维吸附剂的研究开发提供了一条可行之路。 (2) 首次利用外部液体调控相分离过程的方法, 能够量身定制纤维的表面形态结构, 从而制备了表面具有开孔结构的纤维吸附剂。具有这种结构的纤维吸附剂可以降低溶质的传质阻力, 使吸附剂的吸附速率得到了提高。 (3) 选择羟基保护的方法降低聚乙烯醇的亲水性, 使之容易制备成超滤膜, 然后采用一步水解交联法边水解边对膜进行交联, 使膜的亲水性恢复, 制备了亲水性超滤膜, 为制备非特异性吸附低的纤维吸附剂提供了一条新途径。 (4) 分析了蛋白质在树脂填充纤维吸附剂中可能的传质机理, 首先提出了传质阻力方程, 并指出吸附剂基体内的孔扩散与树脂内的孔扩散是吸附过程中传质速率的控制步骤。这对纤维吸附剂的结构设计具有重要的指导意义。 纤维吸附剂和纤维色谱是一种新的概念, 至今未见报道, 有关纤维吸附剂的研究处于国际先进水平。本研究成果对于膜技术与色谱技术的研究与发展具有重要的理论意义, 同时在生物分离、血液净化、水处理以及食品及发酵行业具有极其广阔的应用前景。 2004 年 2 月			