• 研究论文 •

肝素温度敏感色谱填料的制备与性能研究

梁 笑 刘宗建 戴荣继* 王 维 耿芳芳
梁艳丽 孟薇薇 邓玉林*
(北京理工大学生命学院 北京 100081)

摘要 利用自由基聚合法制备了含有聚(*N*-异丙基丙烯酰胺/*N*-丙烯酰氧琥珀酰亚胺)和肝素共聚物的温度敏感的亲和色谱填料;通过热失重分析得到该填料表面聚合物的接枝率为 9.45%;Elison-Morgan 法测定该填料表面的肝素含量为 3.6 mg/g. 将其用作 HPLC 固定相,分离苯和氢化可的松,表明该色谱固定相具有温度敏感特性;该色谱柱对凝血酶具有较强的亲和作用,通过控制温度缩短了凝血酶的释放时间,回收率为 81.4%,这为蛋白质的分离提供了一个快速有效的方法.

关键词 高效液相色谱;聚(*N*-异丙基丙烯酰胺);肝素;凝血酶

Preparation and Characterization of Temperature-responsive Affinity Chromatographic Stationary Phase Modified with Heparin

Liang, Xiao Liu, Zongjian Dai, Rongji* Wang, Wei Geng, Fangfang
Liang, Yanli Meng, Weiwei Deng, Yulin*
(School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081)

Abstract The silica beads modified by poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-*N*-acryloxysuccinimide) and heparin, which was then used as temperature-responsive affinity chromatographic stationary phase were prepared via radical polymerization. Grafting ratio of polymers grafted on surfaces was 9.45% calculated by thermogravimetric analysis (TGA) and the heparin content on surfaces was 3.6 mg/g determined by Elson-Morgan method. The packing column with the modified silica beads as the HPLC stationary phase had temperature-responsive features, which was proved by separating benzene and hydrocortisone. The results also indicated that the strong affinity interaction occurs between thrombin and the modified column, with recovery of 81.4%. The releasing time of thrombin was shortened by controlling the column temperature, which provided a fast and efficient method for protein separation.

Keywords high-performance liquid chromatography; poly(*N*-isopropylacrylamide); heparin; thrombin

聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAAm)是近些年研究非常热门的温度敏感高分子材料之一,它的特性是在水中具有一个临界溶解温度(LCST),约为 32 °C^[1]. 当温度低于其 LCST 时,聚合物链呈现出伸展的构象,表现为

亲水状态;当温度高于 32 °C 时,聚合物链脱水皱缩,发生相分离,转变为疏水状态^[2,3]. 因此,研究者将其接枝到硅胶表面制备了温度敏感的色谱材料,采用纯水作为流动相,通过控制柱温,实现了多种化合物的分

* E-mail: dairongji@bit.edu.cn (Dai, Rongji); Deng@bit.edu.cn (Deng, Yulin)

Received August 11, 2011; accepted November 8, 2011.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20675008) and the National Basic Research Program of China (973 Program, No. 2007CB914103).

中国国家自然科学基金(No. 20675008)和中国自然基础研究发展计划(No. 2007CB914103)资助项目.

离^[4-6].

亲和色谱是利用偶联了亲和配基的亲吸附介质为固定相来吸附目标物质的^[7], 目前被广泛应用于蛋白质的分离和回收. 但是在常规亲和色谱中, 适宜的脱附剂往往很难得到, 在洗脱时常引起目标蛋白质不同程度的变性^[8]. 所以, 研究者在温度敏感色谱填料的研究基础上引入了具有亲和能力的功能性单体, 制备了温度敏感的亲和色谱填料, 仅通过改变温度成功分离了牛血清白蛋白^[9], 转铁蛋白^[10]等.

肝素是存在于哺乳动物体内的一种酸性粘多糖类物质, 与脂蛋白、脂肪酶、凝血酶等具有较强的亲和作用^[11], 在亲和色谱的研究中广泛用于凝血酶的分离纯化与分析. 本文利用聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)(简称 PNIPAAm)和具有较好亲和能力的肝素相结合, 成功制备了温度敏感的肝素色谱填料, 该色谱填料具有较好的温度敏感特性, 对凝血酶具有较好的亲和作用, 能够实现目标蛋白的快速、高效的分离.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

高效液相色谱仪(PU-230, DAD230, 大连依利特公司), 配有柱温箱(HCT-360, 北京迈瑞达科技有限公司); 紫外-可见分光光度计(UV-2550, 香港岛津有限公司); FTIR 红外光谱仪(Spectrum BX FT-IR system, Perkin Elmer); 装柱机(Model 1666 Slurry Packer, Alltech, USA); 热重分析仪(Q50TGA, TA, USA).

N-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm, 分析纯), *N*-丙烯酰氧琥珀酰亚胺(NAS, 化学纯), 均由北京偶合科技有限公司提供; 偶氮二异丁腈(AIBN, 化学纯, 天津市福晨化学试剂厂); 氨基硅胶(5 μm , 100 $\text{\AA}$, 天津博瑞健合色谱技术有限公司), 丙烯酰氯(分析纯, 北京点精通科技有限公司); *N,N*-二甲基甲酰胺(化学纯, 北京化学试剂公司); 低分子肝素钠(北京中西远大科技有限公司); 凝血酶(FIB 试剂盒, 北京世帝科学仪器公司); 其他试剂均为分析纯.

1.2 温度敏感亲和聚合物的合成

将 1.0 g NIPAAm(正己烷重结晶)和 46 mg NAS 溶于 6 mL 1,4-二氧六环(CaCl_2 除水)中, 搅拌抽真空脱气 20 min, 通入氮气后迅速加入 15 mg AIBN(乙醇重结晶), 在氮气保护下 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 12 h. 反应后减压蒸干溶剂, 加入 100 mL 乙醚沉淀, 并反复用丙酮溶解、乙醚沉淀. 过滤收集产物, 室温真空干燥 12 h, 得到聚(*N*-异丙基丙烯酰胺/*N*-丙烯酰氧琥珀酰亚胺), 记为 P(NIPAAm-*co*-NAS).

将 1.0 g 低分子肝素钠溶于 0.04 mol/L 盐酸中, 100 $^{\circ}\text{C}$ 下进行水解反应 30 min, 冷却至室温, 用 80 mL 无水乙醇沉淀过滤后, 室温真空干燥 12 h, 得到部分水解的肝素. 取 0.5 g 共聚物 P(NIPAAm-*co*-NAS)溶于 15 mL 0.2 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)中, 加入 0.25 g 水解的肝素, 室温反应 70 h. 反应后加入 60 mL 丙酮沉淀, 离心收集上清液, 减压蒸干溶剂, 冷冻干燥得接枝肝素的共聚物.

将 0.315 g 接枝肝素的共聚物溶于 2 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中, 加入 1 mL 异丙胺, 室温搅拌反应 24 h, 加入过量乙醚沉淀, 过滤后收集产物, 室温真空干燥 12 h.

1.3 双键改性硅胶的制备

称取 2.00 g 氨基硅胶, 加入 15 mg 阻聚剂对苯二酚, 25 mL 1,4-二氧六环和 3 mL 三乙胺. 抽真空 20 min, 充氮气, 反复 3 次. 氮气保护条件下, 冰浴中缓慢滴加 3 mL 丙烯酰氯, 滴加完毕后常温反应 1 h. 反应完毕后依次用乙醇、蒸馏水和乙醇反复洗涤, 70 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 12 h.

1.4 P(NIPAAm-*co*-NAS)接枝到双键改性硅胶上

称取 1.876 g 双键改性硅胶加入到 30 mL DMF 中, 加入 28 mg AIBN. 抽真空, 充氮气. 氮气保护条件下 50 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应 10 min, 加入 1.876 g NIPAAm 和 87 mg NAS, 氮气保护下 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 12 h. 将硅胶过滤, 依次用乙醇和蒸馏水反复洗涤, 于 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱干燥 12 h, 得产物, 记作 Silica@P(NIPAAm-*co*-NAS).

1.5 制备温度敏感的肝素色谱固定相

水解肝素制备见 1.2 节. 将 1.863 g Silica-P (NIPAAm-*co*-NAS)溶于 15 mL 0.2 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液中, 加入 559 mg 部分水解的肝素, 室温反应 70 h. 过滤后用蒸馏水洗涤, 室温干燥 12 h. 取干燥的接枝了肝素的键合硅胶 1.776 g 加入到 2 mL DMF 中, 加入 1 mL 异丙胺, 室温搅拌反应 24 h, 过滤用乙醇洗涤 2 次, 室温真空干燥 12 h, 得到温度敏感的肝素硅胶固定相.

1.6 温度敏感聚合物和色谱固定相的表征

用紫外-可见分光光度计测定聚合物的最低临界溶解温度(LCST)值: 配制 5 mg/mL 的聚合物的纯水溶液 10 mL, 测定溶液在 500 nm 下不同温度时的透光率, 当溶液透光率为 50%时的温度即为该聚合物的 LCST 值; 用元素分析仪分析硅胶表面改性前后的 C, H, N 的质量分数; 用 Elson-Morgan 法测定硅胶固定相上固定的肝素含量^[12,13]; 用热重分析仪测定改性前后硅胶 0~700 $^{\circ}\text{C}$ 的失重百分率, 计算聚合物在硅胶表面接枝率(Grafting yield)^[14], 公式为:

$$Y_G = \frac{m_g - m_o}{m_o} \times 100\% \quad (1)$$

式中, m_g 为接枝聚合物后硅胶质量, m_o 为双键改性硅胶的质量。

1.7 色谱方法

将改性固定相用高压匀浆法(压力约为 38 MPa)装入(内径 4.6 mm×150 mm)色谱柱中, 匀浆液采用无水乙醇, 顶替液为甲醇。

以苯和氢化可的松作为待测样品, 检测色谱柱的温度敏感特性。色谱条件为: 流动相为纯水, 流速 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm。

凝血酶分离色谱条件: 流动相: A: 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)+0.1 mol/L NaCl (pH 4.5), B: 0.01 mol/L PBS+1.0 mol/L NaCl (pH 7.5), 流速: 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm。

2 结果与讨论

2.1 温度敏感的亲亲和聚合物和亲和色谱固定相制备

接枝了肝素的温度敏感亲和聚合物和温度敏感亲和色谱填料的合成均采用自由基聚合反应, 反应式如图 1 所示。

共聚物的具体制备过程: 单体 NIPAAm 和 NAS 在 AIBN 引发下, 进行自由基聚合反应, 得到共聚物 P(NIPAAm-co-NAS); 加入水解肝素取代其中 NAS 单元的 *N*-琥珀酰氧基团; 加入异丙胺使未发生反应的 NAS 单元完全转化为 *N*-异丙基丙烯酰胺单元, 除去未反应的

活性基团。温度敏感亲和和改性硅胶的制备过程: 氨丙基硅胶与丙烯酰氯反应, 制备得到双键改性硅胶; 在改性硅胶表面通过自由基聚合反应, 制备得到 Silica@P(NIPAAm-co-NAS), 后续反应流程与共聚物相同。

2.2 温度敏感聚合物的 LCST 值测定

对 P(NIPAAm-co-NAS)、接枝了肝素的 P(NIPAAm-co-NAS)以及经异丙胺处理的接枝了肝素的 P(NIPAAm-co-NAS)在纯水中的 LCST 值进行测定。结果显示三种聚合物在水溶液中的透光率都随温度升高而减小, 且分别在 29, 33 和 31 °C 开始突然减小, 证明三种聚合物均具有较强的温度敏感性; 且三种聚合物在纯水中的 LCST 值不同, 分别约为 30.0, 34.5 和 32.5 °C。其中, 在 P(NIPAAm-co-NAS)聚合物链上接枝肝素后, 化合物 LCST 值升高; 异丙胺处理后 LCST 降低, 这是因为肝素为亲水基团, 聚合物链的亲水性增加, 导致其需要更高的温度才能实现亲水性向疏水性的转变; 经异丙胺处理后其表面转变为疏水基团, 聚合物链疏水性增加, 亲水性向疏水性转变不需要较高的温度就可以实现。

2.3 元素分析和热重分析

对氨丙基硅胶、双键改性硅胶和温度敏感的肝素硅胶进行元素分析和热失重分析, 测定结果如表 1 和图 2 所示。从表 1 中可看出, 每步反应后, C 和 H 元素均有所增加, 聚合反应得到的温度敏感的肝素硅胶中三种元素都大幅度增加, 表明表面接枝反应成功。从图 2 能观察到三种硅胶在 100~700 °C 温度范围内均有不同程度的

图 1 合成温度敏感亲和聚合物和固定相的示意图

Figure 1 Scheme of syntheses of temperature-responsive affinity polymers and stationary phases

失重, 其中温度敏感的肝素失重最多, 与元素分析结果基本一致. 根据 700 °C 时硅胶的残留量, 由公式(1)可以计算出接枝了肝素的温度敏感的改性硅胶表面聚合物的接枝率为 9.45%. 这都说明反应是按照图 1 中的路线进行的, 聚合物被成功接枝到硅胶表面.

表 1 硅胶的元素分析及热失重分析结果

Table 1 Thermogravimetric analysis and elemental analysis of silica beads

Sample	Elemental analysis/% Grafting ratio/%			
	C	H	N	
Aminopropyl silica	0.74	0.28	0.27	—
Silica modified with double bonds	1.16	0.35	0.26	4.36
Temperature-responsive silica with heparin	8.34	1.34	1.05	9.45

图 2 热失重分析图: (a)氨基硅胶, (b)双键改性硅胶, (c)温度敏感肝素硅胶

Figure 2 TGA curves of aminopropyl silica, modified silica with double bonds and temperature-responsive silica with heparin

2.4 Elson-Morgan 法测定温敏色谱填料上固定化肝素的含量

Elson-Morgan 法是一种测定己糖胺含量的方法^[12,13], 肝素中包含多个己糖胺单位, 用酸水解成单糖后, 在碱性条件下与乙酰丙酮(2,4-二酮)反应形成生色原, 后者在酸性反应液中与对二甲氨基苯甲醛呈色, 呈色反应与己糖胺含量成线性关系. 用低分子肝素作为标准物质绘制标准曲线, 以蒸馏水为空白, 测定改性硅胶上固定化肝素的含量, 根据线性回归方程求出溶液中肝素的浓度, 计算出键合硅胶上固定化的肝素的含量为 3.6 mg/g.

2.5 色谱柱温度敏感的性能测试

不同温度下, 利用这种改性硅胶制备的色谱柱分离苯和氢化可的松分离色谱图及保留时间变化情况见图 3.

图 3 不同温度下苯和氢化可的松在温度敏感的亲和固定相上的色谱分离图及其保留时间变化情况

Figure 3 Chromatograms and retention time changes of benzene and hydrocortisone separated on temperature-responsive affinity stationary phase at various temperatures

1. Benzene 2. Hydrocortisone; mobile phase: pure water, flow rate: 1.0 mL/min; injection volume: 20 μ L; detection wavelength: 254 nm

随着温度的升高, 二者的保留时间均有所延迟, 这是因为随着柱温升高, 色谱柱表面的疏水性增加, 苯和氢化可的松与固定相表面的疏水相互作用增强, 色谱柱对二者的保留能力增强, 导致保留时间增长, 分离度增加, 这证明所制备的改性硅胶色谱柱具有较好的温度敏感特性. 此外, 由于氢化可的松的疏水性更强, 导致其在该色谱柱上的保留时间比苯长, 保留时间随温度的变化情况也更明显. 但是, 根据表 2 中不同温度下色谱柱的柱效变化情况及图 3, 可以看出随着温度的升高, 两种样品的峰宽增加, 柱效逐渐降低, 这与常规硅胶色谱柱的柱效随温度升高而增加的特性是相反的, 证明硅胶表面键合的聚合物链对固定相表面性能产生了很大的影响. 基于温度对分离度和柱效的双重影响, 在选择分离条件时, 应该同时考虑这两个因素, 才能获得较佳的分离效果.

2.6 凝血酶的色谱分离

在不同温度下, 利用这种改性硅胶制备的色谱固定

表 2 温度敏感的亲和色谱固定相的柱效随温度的变化**Table 2** Column efficiency changes of the temperature-responsive affinity stationary phase at different temperatures

Temperature/°C	Column efficiency (effective theoretical plates)	
	Benzene	Hydrocortisone
5	5023	1460
10	4953	1356
20	3276	1102
30	2613	958
40	1449	912
50	1400	838

相对凝血酶的色谱分离结果以及凝血酶的保留时间变化情况见图 4。

图 4 不同温度下凝血酶在温度敏感的亲和固定相上的色谱分离图及其保留时间变化情况

Figure 4 Chromatograms and retention time changes of thrombin separated on temperature-responsive affinity stationary phase at various temperatures

mobile phase: A: 0.01 mol/L phosphate buffer solution (PBS)+0.1 mol/L NaCl (pH 4.5), B: 0.01 mol/L PBS+1.0 mol/L NaCl (pH 7.5), gradient: 0~20 min: A 100%→B 100%; flow rate: 1.0 mL/min; injection volume: 20 μ L; detection wavelength: 280 nm

从图 4 所示, 可以明显看出, 凝血酶的保留时间随着温度逐渐降低而延长。当温度较低时, 硅胶表面聚合物链表现为亲水性, 为伸展状态, 暴露出肝素分子, 凝血酶由于与肝素分子的亲和作用被吸附在色谱固定相

上, 较难被洗脱, 导致凝血酶的保留时间较长; 当温度升高时, 聚合物链脱水收缩, 肝素分子被包裹隐藏, 亲和作用减弱, 凝血酶更容易被洗脱下来, 凝血酶的保留时间提前。所以, 图 4 结果表明: 该色谱填料具有较好的温度敏感的特性, 对凝血酶具有较强的亲和作用。同时, 该色谱固定相能够使得凝血酶的释放时间提前。

2.7 对凝血酶的活性回收率和亲和容量的测定

亲和色谱柱对于蛋白质的亲和吸附能力是有限的, 所以考察色谱柱对目标蛋白的回收率和亲和容量对于该色谱柱的应用具有重要意义。

用 A 液平衡色谱柱后, 进样 20 μ L, 平衡 20 min 后, 换 B 液将凝血酶洗脱下来, 经计算得, 该色谱柱对凝血酶的回收率约为 81.4%。

用 A 液为流动相时, 凝血酶由于亲和作用不能被洗脱; 而当用 B 液时, 凝血酶被完全洗脱下来, 所以先用 A 液使凝血酶富集在色谱柱上, 当其被凝血酶饱和后, 待平衡后用 B 液将吸附的凝血酶洗脱下来。经计算得, 该色谱柱对凝血酶的亲和容量为 0.18 mg/g。

3 结论

通过自由基聚合法制备的温度敏感的肝素亲和色谱填料用作色谱固定相, 通过结构表征以及考察了不同温度下苯和氢化可的松在该色谱固定相上的色谱保留行为, 结果表明该色谱填料具有温度敏感的性质。且对凝血酶具有较好的亲和作用, 通过改变柱温缩短了凝血酶的释放时间。与常规亲和色谱相比, 提高了蛋白质在色谱柱上的分离释放效率, 为蛋白的分离提供了一个快速、有效的新方法。

References

- Heskins, M.; Guillet, J.-E. *J. Macromol. Sci. Chem.* **1968**, *2*, 1441.
- Qin, A.-X.; Lv, M.-G.; Liu, Q.-F.; Zhang, P. *Appl. Chem.* **2006**, *23*, 581 (in Chinese).
(秦爱香, 吕满庚, 刘群峰, 张平, 应用化学, **2006**, *23*, 581.)
- Liu, Q.-F.; Li, S.-D. *Guangdong Chem. Ind.* **2008**, *35*, 12 (in Chinese).
(刘群峰, 李思东, 广东化工, **2008**, *35*, 12.)
- Sakamoto, C.; Okada, Y.; Kanazawa, H.; Ayano, E.; Nishimura, T.; Ando, M.; Kikuchi, A.; Okano, T. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1030*, 247.
- Go, H.; Sudo, Y.; Hosoya, K.; Ikegami, T.; Tanaka, N. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4086.
- Hosoya, K.; Kimata, K.; Araki, T.; Tanaka, N.; Frechet, J.-M. *J. Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1907.

- 7 Liu, W.-C.; Zhu, J.-W. *Shanghai Chem. Ind.* **2007**, 32, 27 (in Chinese).
(刘望才, 朱家文, 上海化工, **2007**, 32, 27.)
- 8 Miao, Y.; Wen, S.-M.; Ji, X.-S. *Foreign Medical Sciences on Pharmacy* **1999**, 26, 41 (in Chinese).
(苗奕, 温守明, 季小慎, 国外医学药学分册, **1999**, 26, 41.)
- 9 Yoshizako, K.; Akiyama, Y.; Yamanaka, H.; Yoshizako, K. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4160.
- 10 Yamanaka, H.; Yoshizako, K.; Akiyama, Y.; Sota, H.; Hasegawa, Y.; Shinohara, Y. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 1658.
- 11 Wei, C.-H. *J. Biology* **2006**, 23, 35 (in Chinese).
(韦传宝, 生物学杂志, **2006**, 23, 35.)
- 12 Su, C.; Xia, W.-S.; Yao, H.-Y. *Sci. Technol. Food Ind.* **2003**, 24, 74 (in Chinese).
(苏畅, 夏文水, 姚惠源, 食品工业技术, **2003**, 24, 74.)
- 13 Zhang, W.-J. *Biotechnology of Glycoconjugates*, Shanghai Science and Technology Publisher, Shanghai, **1984**, pp. 290~293 (in Chinese).
(张惟杰, 复合多糖生化研究技术, 上海科技出版社, 上海, **1984**, pp. 290~293.)
- 14 Zu, J.-H.; He, S.-Q.; Nho, Y.-C.; Pyo, J.-J.; Yan, F. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, 116, 1414.

(A1108112 Lu, Y.)