

磁性纳米球形聚电解质刷的制备研究

廖丹葵^{1,2} 陈敬伟¹ 叶国鹏¹ 郑燕宁¹ 唐树林¹ 罗秋猷¹ 何日丽¹ 周利琴^{1,2*}

(1.广西大学化学化工学院,南宁 530004;

2.广西石化资源加工及过程强化技术重点实验室,南宁 530004)

摘 要 聚电解质刷因与生物大分子具有良好的相容性而备受关注。以苯乙烯单体(ST)为原料,采用细乳液聚合法制备包覆有 Fe_3O_4 的聚苯乙烯纳米磁核粒子(MPS),以安息香丙烯酸酯(BA)为光引发剂,丙烯酸(AA)为聚电解质刷链原料,制备了链长可控的磁性纳米球形聚电解质刷(MSPB)。考察 BA、AA 和聚合反应时间对合成聚电解质刷链长的影响,优化 MSPB 的制备工艺条件,并采用动态光散射、热重和扫描电镜等手段对 MSPB 的结构和性能进行表征。结果表明:制备 MSPB 的最优工艺条件为:当 ST 为 2.5g,BA/ST=0.1(摩尔比,下同),AA/ST=0.9,聚合反应时间 2.0h 时,未接枝 MPS 平均粒径为 152nm,聚电解质刷链长约为 160nm,并具有超顺磁性。将 MSPB 用于中性蛋白酶固定化,固定化酶含量为 42.9mg/g 载体,固定化酶比活为 $1.75 \times 10^4 \text{ u/g}$ 载体,酶活回收率达 93%,表明 MSPB 可为固定化酶提供一种良好的载体。

关键词 磁性,聚电解质刷,制备,固定化酶

Study on synthesis of magnetic nano-sphere polyelectrolyte brush

Liao Dankui^{1,2} Chen Jingwei¹ Ye Guopeng¹ Zheng Yanning¹ Tang Shulin¹
Luo Qiuxian¹ He Rili¹ Zhou Liqin^{1,2}

(1.School of Chemistry and Chemical Engineering,Guangxi University,Nanning 530004;

2.Guangxi Key Laboratory of Petrochemical Resource Processing and Process Intensification
Technology,Nanning 530004)

Abstract Polyelectrolyte brushes have attracted much attention because of their good compatibility with biological macromolecules.Used styrene as raw material and polystyrene nano-magnetic core particles (MPS) coated with Fe_3O_4 were prepared by microemulsion polymerization.Acrylic acid (BA) was used as photoinitiator,acrylic acid (AA) was polyelectrolyte brush and magnetic nanosphere brush (MSPB) with a long chain length controllable was prepared.The effects of BA,AA and polymerization time on the brush chain length of polyelectrolyte were investigated, and the preparation conditions of MSPB were optimized.The structure and properties of MSPB were characterized by DLS,TG and SEM.The results showed that the optimum conditions were as follows:ST 2.5g,BA/ST=0.1(molar ratio),AA/ST=0.9,polymerizaion time 2.0h,the magnetic particle size of MSPB was 152nm,PAA chain length was 160 nm,and with superparamagnetism.The immobilized enzyme activity was $1.75 \times 10^4 \text{ u/g}$ carrier and the immobilized enzyme content was 42.9mg/g,the recovery rate of enzyme activity was 93%.It showed that MSPB can provide a good carrier for immobilized enzymes.

Key words magnetism,polyelectrolyte brush,preparation,immobilized enzyme

聚电解质刷是由线性聚电解质链的一端接枝在基质表面形成的一种聚合物,具有较大的比表面、良好的单分散性和优异的稳定性,能极大改变表面的生物相容性和吸附特性等性能^[1],且与生物大分子

有良好的相互作用,在蛋白质分离纯化、药物控释、固定化酶和传感器等方面有广泛的应用^[2-3]。在生物工程和食品等领域应用较广,如葡萄糖氧化酶固定化后用于食品检测^[4]。但固定化酶的常用载体形

基金项目:国家自然科学基金(51372043);广西石化资源加工及过程强化技术重点实验室项目(2016K010 和 2015Z003);广西大学大学生实验创新基金(201610593156)

作者简介:廖丹葵(1967-),女,教授,主要从事生物物质分离材料的研究。

联系人:周利琴(1987-),女,助理研究员,主要从事生物制品分离。

式如微球、管、棒和膜材料等由于负载能力及材料本身的局限性,存在固定化量低及酶活损失较大的缺点^[5-6],但聚电解质链与酶结合时因聚合物链的柔性运动可产生缓冲作用,与酶结合时可减少固定化过程中酶构象的改变,从而减少酶的活力损失^[7]。Fan 等^[8]制备了甲基丙烯酸缩水甘油酯的亲水和疏水两种聚合物刷固定胰蛋白酶,酶固定化量是传统方法的 3 倍,且酶活可得到有效保留。因此,链长可控的磁性纳米球形聚电解质刷(MSPB)在固定化酶研究领域具有潜在的应用。

本研究以苯乙烯单体为原料,采用细乳液聚合法制备包覆有 Fe_3O_4 的聚苯乙烯纳米磁核粒子,以安息香丙烯酸酯为光引发剂,丙烯酸为聚电解质刷链原料,制备了 MSPB,并初步研究了 MSPB 对中性蛋白酶的固定化,期望制备出性能优异的固定化酶载体。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

苯乙烯单体(ST)、偶氮二异丁腈(AIBN)、正十六烷、丙烯酸单体(AA)、安息香、三乙胺、丙烯酰氯、十二烷基硫酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris),均为分析纯,上海麦克林生化科技公司; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,均为分析纯,天津大茂试剂厂;中性蛋白酶($3.74 \times 10^4 \text{ u/g}$),南宁庞博生物技术公司。

激光纳米粒度分析仪(DLS, Nano-SZ 型),英国 Malvern 公司;同步热分析仪(TG, STA 449 F3 型),德国 NETZSCH 公司;扫描电子显微镜(SEM, SU8020 型),日本日立公司;核磁共振仪($^1\text{H-NMR}$, Advance III HD600 型),瑞士 Bruker 公司;紫外-可见分光光度计(UV2550 型),日本 Shimadzu 公司;振动样品磁强计(7400 型),美国 Lake Shore 公司;数控超声波清洗器(SK8200HP 型),上海科导超声仪器有限公司;傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR, NICOLET 6700 型),美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 实验步骤

1.2.1 Fe_3O_4 的制备

根据本实验室的前期工作,采用化学沉淀法制备 Fe_3O_4 磁核粒子^[9]。

1.2.2 安息香丙烯酸酯(BA)的制备

BA 采用 Schotten-Baumann 反应合成^[10]。称取 1.0g 安息香溶于 30mL 氯仿中,加入 1.0mL 三

乙胺和 0.5mL 丙烯酰氯,加热到 75°C ,反应 2.0h。产物过 300 目硅胶柱层析,流动相为乙酸乙酯/石油醚($V/V=1:5$,体积比),流速约 10mL/min。

1.2.3 磁性纳米球形聚电解质刷(MSPB)的制备及工艺条件优化

准确称取 2.5g ST、0.5g Fe_3O_4 、0.07g AIBN 和 0.1g 正十六烷,混合均匀,冰浴超声 15min,搅拌速度 200r/min。随后加入 0.1% (wt, 质量分数,下同) 200mL SDS 继续冰浴超声 60min。再加热到 65°C 反应 20h^[11]。将 BA 按一定比例(BA:ST, 摩尔比,下同)溶于丙酮缓慢加入到体系反应一段时间。然后在反应产物中按比例加入 AA(AA:ST)在光反应器中(250W 高压汞灯)进行聚合反应,反应结束后将体系进行透析。并考察 BA、AA 及聚合反应时间等对 MSPB 的聚电解质刷链长的影响。

1.2.4 MSPB 固定化中性蛋白酶

使用含有 50mmol/L NaCl 的 $\text{pH}=7$ 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液溶解 3mg MSPB,制得 2.0mL 1.5mg/mL 溶液,再加入 2.0mL 2.0mg/mL 中性蛋白酶溶液,低温震荡吸附 24h,考察 MSPB 固定化酶的效果。

1.2.5 MSPB 形貌表征

采用 $^1\text{H-NMR}$ 鉴定合成的 BA 的化学结构;采用 DLS 测试 MSPB 的粒径及分布情况,其中聚电解质链长(L_e)=(MSPB 粒径 - MPS 粒径)/2;采用 SEM 观测 MSPB 的表面形貌;采用 TG 分析 MSPB 各成分组成情况,氮气气氛,升温速度 $10^\circ\text{C}/\text{min}$, $30 \sim 1000^\circ\text{C}$;采用 FT-IR 分析 Fe_3O_4 、MPS 和 MSPB 的结构;按照国标 SB/T 10317—1999 测定固定化酶的酶活。

2 结果与讨论

2.1 Fe_3O_4 粒径及 BA 的结构鉴定

Fe_3O_4 的粒径分布情况见图 1(a)。由图可知, Fe_3O_4 平均粒径为 32nm,具有良好的单分散性。

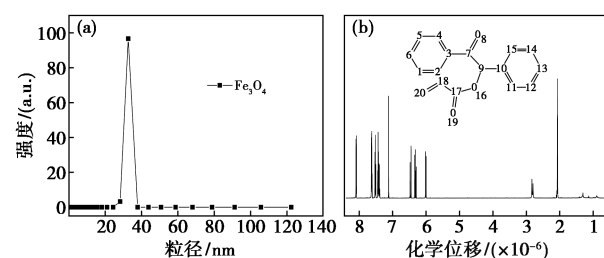


图 1 Fe_3O_4 的粒径分布图(a)及 BA 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图(b)

BA 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图见图 1(b)。由图可知,产物分子为 BA。由于 BA 含有 $\text{C}=\text{C}$ 双键和光引发基团,在紫外光照射下,可在磁性聚苯乙烯纳米微球表面引发丙烯酸单体发生自由基接枝聚合反应形成聚电解质刷链。

2.2 MSPB 合成工艺条件优化

当聚电解质刷链长增加时,单个聚电解质刷链上所带电荷的数量会增加,聚合物刷链层中就能容纳更多的蛋白质分子^[12]。因此考察了 BA、AA 和聚合反应时间对 MSPB 链长的影响。

2.2.1 BA/ST 摩尔比对 MSPB 链长的影响

BA/ST 摩尔比对 MSPB 链长的影响见图 2。由图可知,当 BA/ST 较小时,没有足够的自由基来引发聚合反应。当 BA/ST=0.1 时,聚电解质刷链长可达到最长。若 BA 用量继续增加,过多的 BA 量可引发体系中 AA 单体自聚,从而消耗 AA 量,阻碍了 MSPB 聚电解质刷链的生长。因此,MSPB 合成最佳 BA/ST 为 0.1。

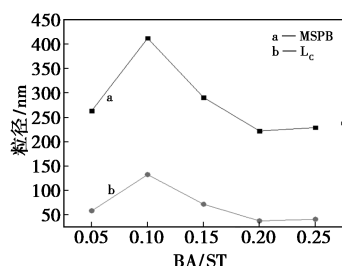


图 2 BA/ST 摩尔比对 L_c 的影响

2.2.2 AA/ST 摩尔比对 MSPB 链长的影响

AA/ST 摩尔比对 MSPB 链长的影响见图 3。由图可知,MSPB 链长随着体系中 AA 加入量的增大而增大,当 AA/ST=0.9 时,链长可达到 140nm,但继续增大 AA 单体的量,链长则不再有太大变化。这可能是随着 AA 加入量的增大,光引发剂 BA 所能引发的单体量已达到饱和,因此聚电解质刷的链长不会再随之增加。因此,MSPB 合成最佳 AA/ST 为 0.9。

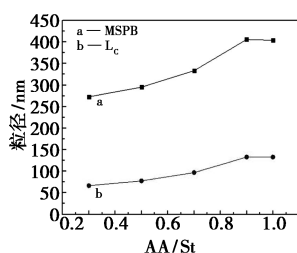


图 3 不同 AA/ST 摩尔比对 L_c 的影响

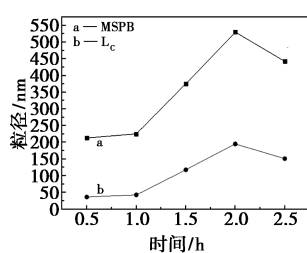


图 4 光反应时间对 L_c 的影响

2.2.3 聚合反应时间对 MSPB 链长的影响

聚合反应时间对 MSPB 链长的影响见图 4。由图可知,MSPB 链长随着时间的增加而增长。当聚合反应时间达到 2.0h 时聚电解质刷链长为 160nm,随后不再增长。由于聚丙烯酸(PAA)有一定的光降解特性,在反应后聚合反应与降解反应基本达到平衡^[13]。因此聚合反应时间较长时,聚电解质链的长度有一定程度下降,不利于链继续增长。因此,MSPB 合成最佳反应时间为 2.0h。

综上,MSPB 最佳合成条件为 2.5g ST,BA/ST=0.1,AA/ST=0.9,聚合反应时间 2.0h。

2.3 磁性纳米球形聚电解质刷的表征

MPS 和 MSPB 的粒径分布情况见图 5。由图可知,未接枝 MPS 的平均粒径为 152nm,接枝后增长到 473nm,即 MSPB 的聚电解质刷链长约为 160nm,具有良好的单分散性。

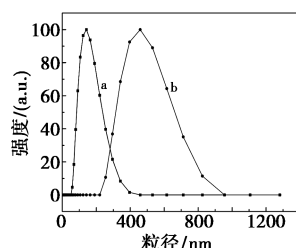


图 5 MPS(a)和 MSPB(b)的粒径分布情况图

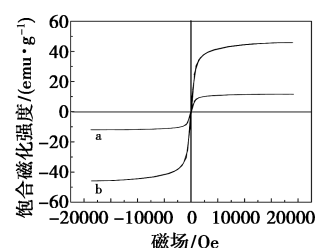


图 6 Fe_3O_4 (a)和 MSPB(a)的磁饱和曲线图

Fe_3O_4 和 MSPB 的磁饱和曲线见图 6。由图可知, Fe_3O_4 的饱和磁化强度为 45.8emu/g,MSPB 的饱和磁强度较 Fe_3O_4 下降了 11.6emu/g,这是由于 Fe_3O_4 纳米颗粒外包裹着 PS 和 PAA,导致磁性减小,但 MSPB 仍具有超顺磁性,可快速地从体系中收集和分离^[14]。

MPS 和 MSPB 的 FT-IR 谱图见图 7。由图可知,MPS 的 FT-IR 谱图中 584cm^{-1} 处为 Fe_3O_4 中 $\text{Fe}-\text{O}$ 的特征吸收峰; 2852 、 2923 和 1452cm^{-1} 处分别为 ST 聚合成 PS 中 CH_2 的对称伸缩峰、不对称伸缩峰和弯曲振动峰; 1600 和 1492cm^{-1} 处为芳香环 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动峰; 3025cm^{-1} 处为苯环 CH 面内弯曲, 698cm^{-1} 处为苯环 CH 面外弯曲振动峰。因此,可以确定 Fe_3O_4 外包覆 PS。而 MSPB 的 FT-IR 谱图中, 1521cm^{-1} 处为芳香环 $\text{C}=\text{C}$ 的伸缩振动峰,而 1278 、 1718 和 3419cm^{-1} 分别为 $\text{C}-\text{O}$ 、 $\text{C}=\text{O}$ 和 $\text{O}-\text{H}$ 的伸缩振动峰,因此可以确定经聚合反应后在 MPS 表面接枝了 PAA,形成了 MSPB。

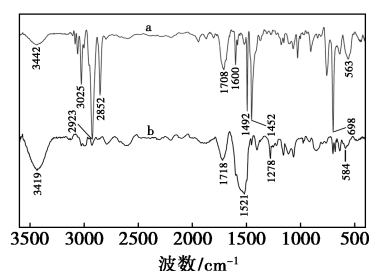


图 7 MPS(a)和 MSPB(b)的 FT-IR 谱图

MSPB 的 SEM 图见图 8。由图可知, MSPB 粒径较为均匀, 且呈现规则的球状, 粒径与动态光衍射测出来的数据相吻合。

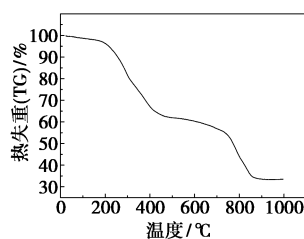
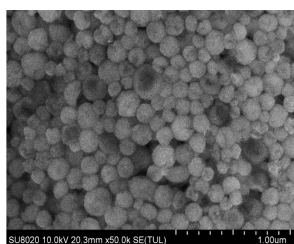


图 8 MSPB 的 SEM 图

图 9 MSPB 的 TG 曲线图

MSPB 的 TG 曲线见图 9。由图可知, MSPB 存在两个明显的失重过程, 第一段失重发生在 200~500℃之间, 其失重率约为 35.8%。这主要是由于 MSPB 中存在的有机物(油酸、聚苯乙烯、聚丙烯酸)发生分解而导致的质量损失。第二段失重发生在 700℃之后, 主要是由于 Fe_3O_4 热降解成 FeO 造成质量的损失^[11], 失重率约为 27.7%。

2.4 MSPB 固定化中性蛋白酶

酶的固定化按 1.2.4 方法操作, MSPB 固定化中性蛋白酶时, 负载量为 42.9 mg/g 载体, 固定化酶比活为 1.75×10^4 u/g 载体, 酶活回收率达 93%, 与其他材料如壳聚糖微球、海藻酸钠微球固定化中性蛋白酶相比^[15-16], MSPB 能将酶活回收率从 40%~50% 提高到 90% 以上, 表现出很好的生物相容性。这可能是由于聚电解质刷具有内部稳定的 pH 与盐浓度环境, 为酶的发挥提供了良好的空间, 使 MSPB 成为一种良好的固定化酶载体。

3 结论

以 ST 为原料, AA 为聚电解质刷链原料, 以 BA 为光引发剂, 制备了 MSPB, 最佳工艺条件为: 2.5 g ST, BA/ST=0.1, AA/ST=0.9, 聚合反应时间 2.0 h。未接枝 MPS 的平均粒径为 152 nm, MSPB 的聚电解质刷链长约为 160 nm, 具有超顺磁性, 能使 MSPB 快速从体系中收集和分离。将

MSPB 进行中性蛋白酶固定化, 表明 MSPB 可做为固定化酶等生化分离过程的良好载体。

参考文献

- [1] Jain P, Greory L B, Merlin L B. Applications of polymer brushes in protein analysis and purification[J]. Annual Review of Analytical Chemistry, 2009, 2(1): 387-408.
- [2] Cooper C L, Dubin P L, Kayitmaze A B, et al. Polyelectrolyte-protein complexes[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2005, 10(1-2): 52-78.
- [3] 王思怿, 郭旭虹, 陈凯敏. 聚合物刷与生物分子相互作用的研究进展[J]. 功能高分子学报, 2016, 29(4): 359-376.
- [4] 朱运平, 伍少明, 李秀婷, 等. 微生物葡萄糖氧化酶的生产及其在食品工业中应用的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2013(5): 165-172.
- [5] 李丽娟, 马贵平, 赵林果. 固定化酶载体研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(11): 105-113.
- [6] Wang M, Qi W, Su R, et al. Advances in carrier-bound and carrier-free immobilized nanobiocatalysts[J]. Chemical Engineering Science, 2015, 135: 21-32.
- [7] Li N, Wei Z, Ying S, et al. Preparation of a novel polymer monolith with functional polymer brushes by two-step atom-transfer radical polymerization for trypsin immobilization[J]. Journal of Separation Science, 2014, 37(23): 3411-3417.
- [8] Fan C, Shi Z, Pan Y, et al. Dual matrix-based immobilized trypsin for complementary proteolytic digestion and fast proteomics analysis with higher protein sequence coverage[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(3): 1452-1458.
- [9] 周敬豪, 徐存华, 李玉婵, 等. 磁性壳聚糖微球的合成及其在固定化血管紧张素转化酶的应用[J]. 化工进展, 2013, 32(10): 2440-2445.
- [10] Wang X, Wu S, Li L, et al. Synthesis of Spherical polyelectrolyte brushes by photoemulsion polymerization with different photoinitiators[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2011, 50(6): 3564-3569.
- [11] Baharvand H, Rabiee A. Synthesis of polyelectrolyte brushes on spherical magnetic polymer particles[J]. Journal of Polymer Research, 2014, 21(11): 596.
- [12] Wang S, Chen K, Li L, et al. Binding between proteins and cationic spherical polyelectrolyte brushes: effect of pH, ionic strength, and stoichiometry[J]. Biomacromolecules, 2015, 14(3): 818.
- [13] 王艳, 解一军. 紫外光引发丙烯酸酯类单体的聚合反应[J]. 高分子材料科学与工程, 2014, 30(5): 29-33.
- [14] 吴颖, 王君, 景晓燕, 等. 磁性高分子微球的制备及应用[J]. 化工新型材料, 2002, 30(8): 23-26.
- [15] 李皓, 钟星, 张辉, 等. 中性蛋白酶在海藻酸钠和壳聚糖中的固定化研究[J]. 生物资源, 2016, 38(4): 50-54.
- [16] 王红艳, 朱建星. 多胺化壳聚糖微球固定化 AS1.398 中性蛋白酶[J]. 沈阳化工大学学报, 2012, 26(4): 327-330.

收稿日期: 2017-06-30