

聚乙二醇修饰的高分子磁性微球的合成及表征

姜波, 官月平, 王靖, 刘会洲

(中国科学院化工冶金研究所分离科学和工程青年实验室及生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 利用显微照相、红外光谱、激光粒度分析等手段对所合成的聚乙二醇(PEG)修饰的四氧化三铁/聚乙烯醇(PVA)磁性高分子微球的形貌、结构组成、磁响应性、酸碱稳定性以及温度稳定性进行了表征。结果表明, 所合成高分子磁性微球的粒度分布较窄, 具有超顺磁性和较强的磁响应性。微球被 PEG 有效功能化, 在三相相转移催化和生物技术领域中具有良好的应用前景。

关键词: 磁性; 高分子微球; 聚乙二醇修饰; 聚乙烯醇; 合成; 表征

中图分类号: TQ028.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2001)04-0382-05

1 前言

70年代中期, Rogen等^[1]将可溶性相转移催化剂(phase transfer catalyst, PTC)固载到高分子载体上, 制得一类既不溶于水、也不溶于有机相的固载化聚乙二醇(PEG)相转移催化剂。由于 PEG 来源丰富, 价格低廉, 且稳定性好、无毒性, 因此其应用越来越受到人们的重视。磁性高分子微球作为一类新型的功能高分子材料, 可以在磁场作用下方便、快速、低能耗地得以分离。通过共聚或表面改性向其中引入羟基、羧基、氨基等功能性基团, 使磁性高分子微球在生物技术领域中的应用愈来愈受到重视, 目前已有许多关于磁性高分子微球吸附及分离蛋白质的研究报道^[2-5]。在磁性微球表面固载 PEG, 除了其潜在的催化性能外^[1], 由于 PEG 自身的特性以及对酶的固定化及修饰作用^[6,7], 可以改善磁性微球的生物相容性, 扩展其在生物技术领域中的应用。

2 试剂与方法

2.1 试剂

苯乙烯, 分析纯, 北京福星化工厂生产, 使用前除去阻聚剂; 聚乙二醇(PEG)1000, 2000, 4000, 日本产进口分装; 氢氧化钠, 分析纯, 北京化工厂; 过氧化苯甲酰(BPO), 国产分析纯; 四水合氯化亚铁, 分析纯, 北京双环试剂厂; 六水合氯化铁, 分析纯, 北京市朝阳区通惠化工厂; 醋酸乙烯酯, 化学纯, 北京市旭东化工厂; 环氧氯丙烷, 分析纯, 天津市化学试剂六厂; 二甲基甲酰胺, 分析纯, 北京化工厂; 二乙烯基苯, 化学纯, 昆山市连沙助剂厂。

2.2 固载 PEG 的磁性微球的合成

2.2.1 四氧化三铁/PVAc 磁性微球的合成

将 35 g 自制的磁凝体($d = 8 \text{ nm}$, 按文献[8]制备, 其中四氧化三铁含量约 15 g)溶入 100 ml 醋酸乙烯酯及 10 ml 二乙烯基苯所组成的有机相中, 充分振荡混合, 并加入热敏性引发剂过氧化苯甲酰, 使磁凝体与引发剂完全混溶于有机相中, 制得油相磁性胶体。在一个带垂直挡流板的 2 L 圆柱型搅拌式反应器中加入 1000 ml 蒸馏水, 分别加入适量的 PVA124 和 PVA1750 作为悬浮聚合的分散剂。在 60°C 下恒温搅拌 1 h, 使水相混合均匀后, 引入磁性油相胶体。维持反应在 75°C 进行 4 h, 随后升温到 90°C 熟化 3 h, 使微球固化。冷却后, 产物用磁铁沉降分离并用水反复洗涤数次, 再用甲醇洗涤 3 次后自然挥干备用。

收稿日期: 2000-09-08, 修回日期: 2000-12-05

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(编号: 29925617)

作者简介: 姜波(1976-), 男, 湖北省武汉市人, 硕士研究生, 生化工程专业; 刘会洲, 通讯联系人。

2.2.2 PEG 侧链的固载化

取干燥后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PVA}$ 磁性微球 10 g, 用甲醇洗涤数次后, 将其转移到含有 200 ml 甲醇、5 g 氢氧化钠、3 ml 蒸馏水的圆底三口瓶中, 略加搅拌, 50°C 下恒温反应 4 h, 使醋酸乙烯酯微球上的醋酸基团醇解, 在磁性微球表面产生可用于功能化的羟基. 当醇解反应完成后, 用磁铁分离出磁性微球, 转移至 100 ml 锥瓶中, 加入环氧氯丙烷 20 ml 和等量蒸馏水, 用氢氧化钠调节溶液 pH 约为 11.3, 在 33°C 及 140 r/min 的转速下反应 24 h, 使磁性微球上的羟基得以活化, 产生环氧基团. 反应结束后, 用磁铁将磁性微球分离, 转移至含有适量不同分子量 PEG(主要用 PEG 4000 表征)的 30 ml 二甲基甲酰胺的锥瓶中, 在磁力搅拌下, 于 85°C 反应 24 h, 产物经磁分离, 反复用水洗涤后干燥备用.

2.3 PEG 修饰的高分子磁性微球的表征

红外光谱: 将固载 PEG 4000 侧链后的磁性微球样品在 65°C 下干燥 48 h, KBr 压片, 用 Bruker Vector 22 型红外光谱仪测定和比较固载前后的红外光谱.

粒度分析: 固载 PEG 4000 及未固载 PEG 的样品经适度稀释之后, 用 Malvern 激光粒度仪分析测定磁性微球固载前后的粒度分布以及平均粒径.

显微摄影: 固载 PEG 4000 及未固载 PEG 的样品经适度稀释之后, 用 Nikon 显微镜观察反应前后微球形貌, 并摄影.

酸碱稳定性测定: 为考察 Fe_3O_4 的包埋效果以及反应中的变化及其使用范围, 采用邻菲罗啉法^[9]测定了固载 PEG 后的磁性微球在不同 pH 溶液中铁离子浓度随时间的变化.

热稳定性分析: 采用变温红外光谱测定.

PEG 含量测定: 用分析红外光谱相对峰强度方法测定固载 PEG4000 的微球中 PEG 大致含量.

磁响应性测定: 参照文献[10]的方法, 取 0.1 g 固载 PEG 的磁性微球分散于 10 ml 水中(10 ml 刻度试管中), 经由表面 3500 Gs 的磁分离或自然沉降一定时间后, 取离液面 1/2 高度处溶液, 用 721 型分光光度计测定 580 nm 波长下的溶液透光率.

3 实验结果与讨论

3.1 反应前后磁性微球的形貌分析

将反应前后的磁性高分子微球用蒸馏水稀释一定倍数, 采用改进的 Malvern 激光粒度分析仪^[11]分析样品在连接 PEG 侧链前后的水力学半径的变化及粒度分布. 图 1 是磁性微球的粒径分布, 可以看出连接前后粒径大致为正态分布. 随着 PEG 侧链的连接, 磁性微球的水力学半径增加. 图 2 是反应前后的显微照片, 从图可见, 反应前磁性微球表面光滑, 呈现出较好的球形, 而与 PEG 反应后的磁性微球, 其边缘结构松散, 存在许多侧链, 这可能是反应中微球表面交联被破坏, 表面 PVA 侧链伸展 PEG 与其较易反应而形成的. 由于表面 PVA 侧链伸展, 导致由激光粒度分析仪所测定的连接 PEG 后的磁性微球水力学半径增加达 $1\ \mu\text{m}$ 以上, 平均粒径由 $22.26\ \mu\text{m}$ 增加到 $23.41\ \mu\text{m}$.

3.2 红外光谱分析

将固载 PEG 4000 侧链后的磁性微球样品在 65°C 下干燥 48 h, KBr 压片, 测定和比较了它们

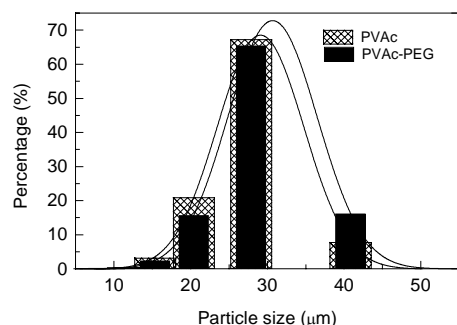
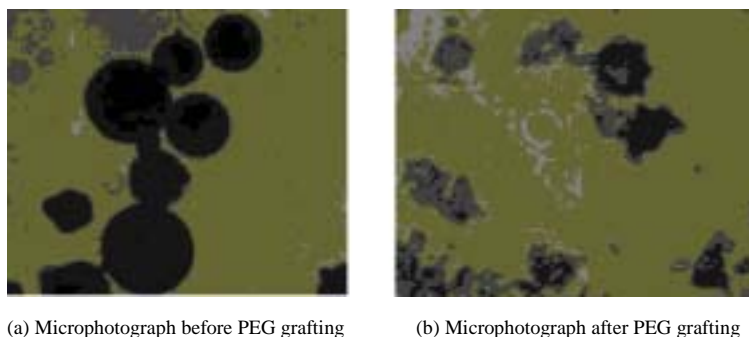


图 1 磁性微球的粒径分布及分布拟合
Fig.1 Size distribution of the magnetic microspheres

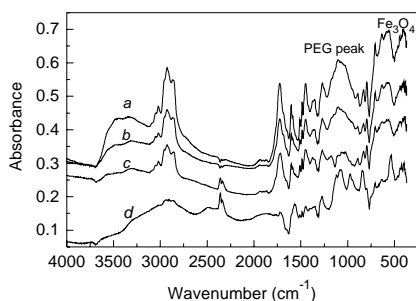


(a) Microphotograph before PEG grafting (b) Microphotograph after PEG grafting

图2 反应前后的显微形貌

Fig.2 Photographs before and after grafting reaction (640×)

的红外光谱,结果如图3所示. PEG 4000及PEG1000在波数 1100 cm^{-1} 附近存在一组强吸收峰,对应于PEG分子中的C—O—C键的伸缩振动,可用作鉴定PEG存在的特征峰位,用于确定PEG是否已成功地固载到磁性微球上^[12]. 由图可见,固载PEG侧链的磁性微球在波数 1100 cm^{-1} 处存在较强的吸收峰,而在连接PEG侧链前的各步反应产物中不存在此吸收峰,因此可确证PEG侧链已经有效固载. 由谱图可见,磁性高分子微球中仍然存在着羟基,在 550 cm^{-1} 处的强吸收峰对应为 Fe_3O_4 的特征峰,在 1600 cm^{-1} 处的吸收峰则是交联剂二乙烯基苯中苯环结构所对应的特征峰. 由于PEG与构成磁性高分子微球的聚乙烯醇在分子结构上的相似性,无法通过滴定在分子链中的羟基数来确定PEG的含量. 由于在红外光谱中PEG分子的C—O—C键的伸缩振动十分显著,而PVA中则不存在C—O—C键的伸缩振动,因此采用C—O—C键伸缩振动的峰强度 $I_{\text{C-O-C}}$ 与高分子母体碳氢峰强度 I_{CH_2} 之比来估计被固载的PEG含量,当PEG含量较低时,添加PEG引起的碳氢峰强度的增加相对于高分子母体碳氢峰强度而言是很小的,当PEG含量较高时此法误差较大而会使比值偏低. 根据 $I_{\text{C-O-C}}/I_{\text{CH}_2}$ 对PEG含量作图所得到的工作曲线(图4),由固载化后的红外光谱的相对强度可求出固载PEG含量约为 190 mg/g .



(a) IR spectra after grafting with PEG1000
(b) IR spectra after grafting with PEG4000
(c) IR spectra after reaction with epichlorohydrin
(d) IR spectra of PVA magnetic microsphere

图3 固载PEG反应前后的IR图

Fig.3 IR spectra of PEG/PVA/ Fe_3O_4 and PVA

3.3 磁性微球的酸碱稳定性

固载化PEG作为三相催化剂时,其使用条件主要为碱性,磁性微球在生物技术领域中的应用主要集中在弱酸性环境到弱碱性环境. 为考察固载PEG后的磁性微球在其主要应用范围内的酸碱稳定性,即 Fe_3O_4 的包埋稳定性,选择了 $1\text{ mol/L HCl}(\text{pH}=0)$, $0.01\text{ mol/L HCl}(\text{pH}=2)$, $\text{H}_2\text{O}(\text{pH}=7)$, $0.01\text{ mol/L NaOH}(\text{pH}=12)$, $1\text{ mol/L NaOH}(\text{pH}=14)$ 共5种不同pH值的溶液,考察了干重为 300 mg 的固载PEG侧链后的磁性高分子微球浸没于 40 ml 溶液中时,溶液中铁离子含量随时间的变化,结果如图5所示. 由图可以看出,固载PEG侧链后的磁性高分子微球在 1 mol/L HCl 中不稳定, Fe_3O_4 很快几乎全部被溶解. 这主要是由于固载化PEG时,高分子微球在羟基化过程中经历了一个由疏水

表面向亲水表面转化的过程,微球内部结构变得更为亲水和松散,所以在强酸性环境中,盐酸渗入高分子微球内部而将 Fe_3O_4 溶解. 在 $\text{pH}=2\sim 14$ 范围磁性微球均较稳定. 在 $\text{pH}=2$ 的盐酸溶液中,开始时有部分 Fe_3O_4 溶解,这主要是反应时高分子表面 Fe_3O_4 的包埋程度下降所致,在 48 h 后溶液中的铁离子含量趋于稳定(图 5),尚不及 1 mol/L HCl 溶液中的铁离子浓度的 1%,与官月平等^[8]的研究结果相符. 在中性水溶液中,几乎不存在 Fe_3O_4 的泄露,在碱性环境下,磁性微球也十分稳定,因此在其主要应用 pH 范围内,固载 PEG 的磁性高分子微球磁稳定性很好.

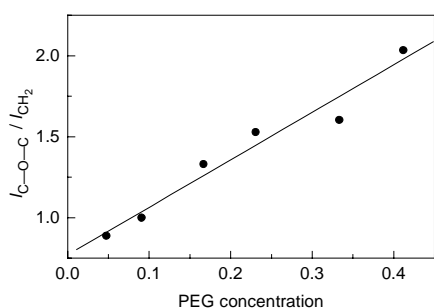


图 4 $I_{\text{C-O-C}}/I_{\text{CH}_2}$ 与 PEG 4000 含量的关系

Fig.4 $I_{\text{C-O-C}}/I_{\text{CH}_2}$ vs. PEG4000 concentration

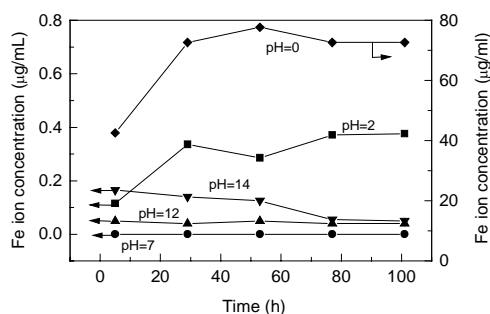


图 5 溶液中 Fe 浓度随时间的变化

Fig.5 Change of Fe ion concentration in solution with time

3.4 磁性微球的热稳定性

一般生物技术应用的温度不超过 60°C , 因此采用变温红外光谱方法测定了 $5\sim 60^\circ\text{C}$ 范围固载 PEG 侧链的磁性高分子微球的红外光谱随温度的变化,如图 6 所示. 由图可见,在 $5\sim 60^\circ\text{C}$ 范围内,固载 PEG 的磁性高分子微球的红外光谱中 PEG 分子中的 C—O—C 键的伸缩振动、高分子主体 CH_2 峰强度均随温度的升高而加强. 但在此温度范围之内,既无原有特征峰的消失,也无新官能团所对应的特征峰的出现,在主要的生物技术应用温度范围之内固载 PEG 的高分子磁性微球的热稳定性良好.

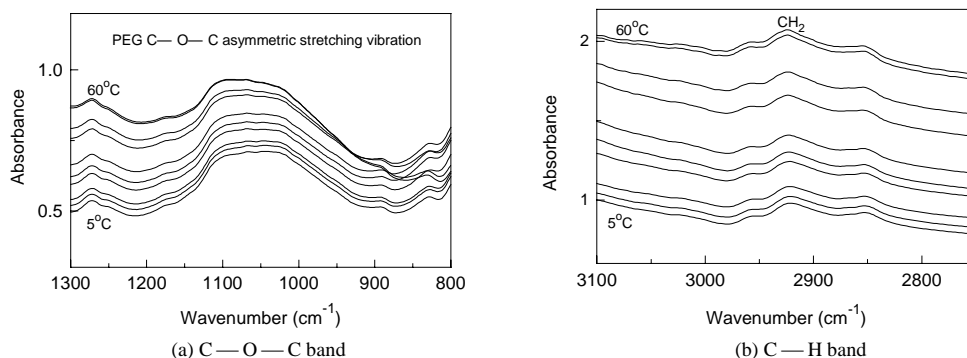


图 6 高分子磁性微球的红外变温谱图

Fig.6 IR spectra of the magnetic microspheres at different temperatures

3.5 高分子微球的磁响应性测定

将微球分散于水溶液中,测定在有或无外界磁场的作用下、经过不同的磁分离时间或自由沉降时间后溶液透光率的变化,如图 7 所示. 由图 7(a)可知,固载 PEG 的高分子磁性微球仅经 10 min 磁分离后,溶液透光率可超过 90%,基本达到完全分离;而无磁场时即使自然沉降 2 h,溶液透光率也只能达到约 50%,可见高分子微球的磁分离效果十分显著.

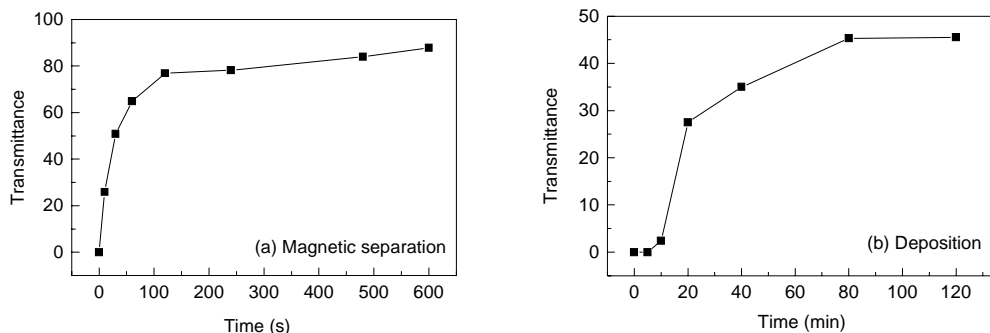


图7 磁分离或自由沉降中透光率与时间的关系

Fig.7 Transmittance-time curves of the suspension of PEG-modified magnetic microspheres

4 结论

(1) 采用悬浮聚合的方法, 通过高分子功能化反应, 获得了固载有较高含量的功能化 PEG 侧链的 PVA 高分子磁性微球。

(2) PEG 侧链可以有效固载, PEG4000 固载量约为 190 mg/g, 高分子微球具有较好的形貌和粒度分布; 高分子磁性微球在 pH=2~14 范围中均较稳定, 在 5~60°C 温度范围内十分稳定, 热稳定性能良好; 由于 Fe₃O₄ 的存在, 使得合成的高分子微球具有良好的磁响应性。

参考文献:

- [1] Rogen S L, Dulak L. Solid Phase Cosolvents [J]. J. Am. Chem. Soc., 1977, 99(2): 623-624.
- [2] 邱广明, 孙宗华. 用吸附-交联法在磁性胶体粒子上固载中性蛋白酶[J]. 生物化学与生物物理进展, 1992, 20(4): 311-314.
- [3] Bergemann C, Muller-Schulte D, Oster J, et al. Magnetic Ion-exchange Nano- and Microparticles for Medical, Biochemical and Molecular Biological Applications [J]. J. Magn. Magn. Mat., 1999, 194: 45-52.
- [4] Koneracka M, Kopcansky P, Antalík M, et al. Immobilization of Proteins and Enzymes to Fine Magnetic Particles [J]. J. Magn. Magn. Mat., 1999, 201: 427-430.
- [5] 丁小斌, 孙宗华, 万国祥, 等. 热敏性磁性高分子微球同蛋白质的相互作用 [J]. 高分子学报, 2000, (1): 9-13.
- [6] Motoshi Suzuki, Masashige Shinkai, Masamichi Kamihira, et al. Preparation and Characteristics of Magnetite-labelled Antibody with the Use of Poly (ethylene glycol) Derivative [J]. Biotechnol. Appl. Biochem., 1995, 21: 335-345.
- [7] Yoshimoto T, Mihama T, Takahashi K, et al. Chemical Modification of Enzymes with Activated Magnetic Modifier [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1987, 145: 908-914.
- [8] 官月平, 刘会洲, 安振涛, 等. 超顺磁性聚合物微球及其制造方法 [P]. 中国专利: 98 124 516.1. 1998-12-10.
- [9] 陈国珍, 黄贤智. 紫外-可见分光光度法 [M]. 北京: 原子能出版社, 1987. 164.
- [10] 丁小斌, 孙宗华, 万国祥, 等. 热敏性高分子包裹的磁性微球的性质及表征 [J]. 高分子化学, 1999, (6): 674-679.
- [11] 王浩然, 安震涛, 杨传芳. 用 Malvern 激光粒度仪测量液滴粒度的改进 [J]. 化工冶金, 1999, 20(3): 283-285.
- [12] 蒋芙, 梁逊, 陈伟朱, 等. 固载化聚乙二醇树脂的合成及其接肽性能研究 [J]. 化学学报, 1987, 45: 1112-1118.

Synthesis and Characterization of PEG-modified Polymer Magnetic Microspheres

JIANG Bo, GUAN Yue-ping, WANG Jing, LIU Hui-zhou

(Youth Lab. Sep. Sci. & Eng., State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Chem. Metall., CAS, Beijing 100080, China)

Abstract: PEG-modified Fe₃O₄/PVA magnetic polymer microspheres were synthesized and characterized by microphotography, laser diffraction particle analysis, FT-IR spectroscopy etc. The results indicate that the size of microspheres presents a Gaussian distribution, and PEG could be immobilized to PVA magnetic microspheres. The magnetic polymer microspheres are stable in a wide range of pH and temperature. The contents of PEG and Fe₃O₄ were about 190 mg/g and 100 mg/g in the microspheres respectively. These properties make the microspheres promising in applications in the field of catalysis and biotechnology.

Key words: magnetim; polymer microsphere; PVA; PEG modification; synthesis; characterization