

## 接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对溶菌酶的吸附行为与吸附机理

付红艳 高保娇\* 牛庆媛

(中北大学化学工程系, 太原 030051)

**摘要:** 采用反相悬浮聚合法制备了甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)与 *N*-乙烯基吡咯烷酮(NVP)的交联共聚微球 HEMA/NVP, 然后采用“接出”法, 实施了甲基丙烯酸(MAA)在交联微球表面的接枝聚合, 制得了接枝微球 PMAA-HEMA/NVP. 以溶菌酶(LYZ)为模型碱性蛋白, 深入研究了接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对碱性蛋白的吸附性能与吸附机理. 测定了微球 PMAA-HEMA/NVP 的 zeta 电位, 考察了 PMAA 接枝度、介质 pH 值及离子强度等因素对体系吸附性能的影响. 结果表明, 在较大的 pH 范围内, 接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 的 zeta 电位为绝对值较大的负值, 即其表面携带有高密度的负电荷. 在强静电相互作用的驱动下, 接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对溶菌酶表现出很强的吸附能力. 随介质 pH 值的增高, 接枝微球对溶菌酶的吸附容量呈现先增大后减小的变化趋势, 在与溶菌酶等电点接近的 pH 值处(pH=9), 具有最大的吸附容量(90 mg·g<sup>-1</sup>); 离子强度对接枝微球的吸附能力也有较大的影响, 当 pH<9 时, 溶菌酶吸附容量随 NaCl 浓度的增高而减小; 当 pH>9 时, 吸附容量随 NaCl 浓度的增高而增大.

**关键词:** 聚甲基丙烯酸; 聚合物接枝微球; 碱性蛋白质; 溶菌酶; 吸附机理

**中图分类号:** O647

## Adsorption Behavior and Mechanism of Grafted PMAA-HEMA/NVP Microspheres toward Lysozyme

FU Hong-Yan GAO Bao-Jiao\* NIU Qing-Yuan

(Department of Chemical Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, P. R. China)

**Abstract:** The crosslinking copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and *N*-vinylpyrrolidone (NVP) was performed using the inverse suspension polymerization method resulting in crosslinked HEMA/NVP microspheres. Subsequently, the graft polymerization of methacrylic acid (MAA) was conducted using the “grafting from” method and the grafted PMAA-HEMA/NVP microspheres were obtained. The adsorption property and adsorption mechanism of the grafted microspheres were investigated in depth using lysozyme (LYZ) as a basic protein model. The zeta potential of the grafted microspheres was determined. Several factors that affected the adsorption property of the system such as the pH of the medium, the grafting degree of the microspheres and the ionic strength were examined. Experimental results indicate that in a wide pH range, the zeta potential of the grafted PMAA-HEMA/NVP microspheres has a large negative value. Therefore, a high density of negative charge is present on the surfaces of the grafted microspheres. The strong electrostatic interaction results in which the grafted PMAA-HEMA/NVP microspheres exhibit very strong adsorption ability toward lysozyme. The adsorption capacity of the grafted microspheres for lysozyme initially increases and then decreases as the pH increases and a maximum adsorption (90 mg·g<sup>-1</sup>) is found at pH=9, which is close to the isoelectric point of lysozyme. The ionic strength affects the adsorption property of the grafted microspheres greatly. As pH<9, the adsorption capacity of lysozyme decreases as the NaCl concentration increases, whereas as pH>9, the adsorption capacity of lysozyme increases as the NaCl concentration increases.

Received: July 22, 2009; Revised: November 5, 2009; Published on Web: December 21, 2009.

\*Corresponding author. Email: gaobaojiao@126.com; Tel: +86-351-3924795.

The project was supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province, China (2008021013).

山西省自然科学基金(2008021013)资助项目

**Key Words:** Polymethacrylic acid; Grafted polymeric microspheres; Basic protein; Lysozyme; Adsorption mechanism

溶液中的蛋白质具有在界面上聚集的强烈倾向, 研究蛋白质大分子在聚合物材料表面的吸附现象, 在生命科学中具有十分重要的意义. 蛋白质在聚合物材料表面的吸附聚集, 往往带来负性的影响, 比如, 因血液蛋白在外科植入材料表面的吸附会导致凝血, 在心血管植入物表面会发生血栓, 体液中蛋白在植入材料表面的吸附会导致感染等不良的生物反应, 蛋白质在过滤膜上的聚集则会导致膜的污染等<sup>[1-4]</sup>. 但是, 蛋白质在聚合物材料表面的吸附在生物医学、药学等领域又可发挥积极的正性作用, 比如在免疫诊断化验、药物释放体系的设计、蛋白质的分离纯化、酶的固定化(物理吸附)、生物传感器的构建等方面<sup>[5-9]</sup>, 蛋白质在聚合物材料表面的吸附都是十分有价值的过程与现象. 为了有效地控制上述这些过程, 对蛋白质的表面吸附过程与吸附机理需要进行深入的研究. 还有, 在血液净化治疗中, 采用血液灌流技术去除体内过量的低密度脂蛋白(LDL)是目前治疗由高脂血症所导致的各种心脑血管疾病的有效治疗手段<sup>[10-11]</sup>. 而制备对低密度脂蛋白具有高选择性吸附性能的聚合物材料, 是实施该医疗技术的关键问题. 低密度脂蛋白的表面含有正电性的赖氨酸和精氨酸等氨基酸残基, 是表面带有正电荷的碱性蛋白质, 因此, 表面携带羧基及磺酸基团的聚合物材料对 LDL 具有高效的吸附性能<sup>[12-13]</sup>.

聚 *N*-乙基吡咯烷酮(PVP)与聚甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA), 是两种具有良好生物相容性甚至具有血液相容性的生物医用聚合物材料<sup>[14-15]</sup>, 在组织工程学、生物传感器及药物释放等领域都具有重要的应用价值<sup>[16-18]</sup>. 本研究采用反相悬浮聚合制备了单体 *N*-乙基吡咯烷酮(NVP)与甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)的交联共聚微球 HEMA/NVP, 期望用作为血液灌流吸附法去除 LDL 的基质材料. 为进一步提高或改善其性能, 生物医用聚合物材料往往通过接枝聚合进行有效的表面改性, 比如, Müller-Schulten 等<sup>[19]</sup>将甲基丙烯酸二乙基胺基乙酯接枝聚合到聚丙烯酰胺载体上, 利用其正电荷性, 提高聚合物载体材料对 DNA 的结合容量, Nho 等<sup>[20]</sup>为了提高纤维素透析膜的血液相容性, 将丙烯酸与甲基丙烯酸聚乙二醇酯接枝聚合到纤维素表面, Mirzadeh 等<sup>[21]</sup>将甲基丙烯酸羟乙酯接枝聚合到乙-丙橡胶表面, 降低其对

细胞的黏附性等. 为了显著提高共聚微球 HEMA/NVP 对 LDL 的吸附能力, 本研究设计并实施了在共聚微球 HEMA/NVP 表面接枝聚合甲基丙烯酸(MAA), 制备了接枝微球 PMAA-HEMA/NVP. 接枝微球材料 PMAA-HEMA/NVP 既具有生物相容性, 表面又携带有大量带负电荷的羧基, 在清除血液中过量 LDL 的血液净化治疗方面具有潜在的应用价值. 本文以溶菌酶(LYZ)为碱性蛋白的模型蛋白, 较深入地研究了功能微球材料 PMAA-HEMA/NVP 对溶菌酶的吸附性能与机理, 对于在血液灌流技术中使用吸附材料 PMAA-HEMA/NVP, 去除血液中过量 LDL 具有重要的基础性参考价值.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

*N*-乙基吡咯烷酮(NVP, 博爱新开源制药有限公司), 分析纯, 使用前经减压蒸馏提纯; 甲基丙烯酸  $\beta$ -羟乙酯(HEMA, 天津市化学试剂研究所), 分析纯, 使用前经减压蒸馏提纯; *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺(MBA, 淄博东普化工有限公司), 化学纯; 甲基丙烯酸(MAA, 天津市福晨化学试剂厂), 分析纯, 使用前经减压蒸馏提纯; 二氯亚砷(天津市福晨化学试剂厂), 分析纯; 溶菌酶(LYZ, 杭州春蕾饲料科技有限公司), 化学纯. 实验用水为二次蒸馏水.

1700 型傅立叶红外光谱仪(FTIR, 美国 Perkin-Elmer 公司); 438VP 型扫描电子显微镜(SEM, 英国 LEO 公司); UV-2602 型紫外-可见分光光度计(上海尤尼柯公司); PHS-3C 精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司); THZ-92C 气浴恒温振荡器(上海博迅实业有限公司); Zetasizer Nano-Z 型 zeta 电位分析仪(英国 Malvern Instrument 公司); TG16-WS 型台式高速离心机(长沙湘仪离心机仪器厂).

### 1.2 接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 的制备与表征

#### 1.2.1 交联微球 HEMA/NVP 的制备

依据文献[22]所述方法, 先采用反相悬浮聚合, 制备 HEMA 与 NVP 交联共聚微球, 具体过程如下: 搅拌下将分散剂 Span-60 溶于液体石蜡中, 构成连续相油相; 将单体 HEMA 与 NVP 与一定量的二次蒸馏水混溶, 并溶入交联剂 MBA, 构成分散相水相; 在四口瓶中将油相加热到 35 °C, 然后将水相加

入其中,充分搅拌,使两相充分分散,加入引发剂过硫酸铵,于 65 °C 恒温且在氮气保护的条件下进行反相悬浮聚合 8 h,制得平均粒径为 90 μm 的透明交联微球 HEMA/NVP.

### 1.2.2 接枝微球 PMAA-NVP/HEMA 的制备与表征

参照文献[22]所述步骤,先以甲基丙烯酸和二氯亚砷为试剂合成甲基丙烯酰氯,然后以丙酮为溶剂,使经溶胀的交联微球 HEMA/NVP 与甲基丙烯酰氯反应,制得表面键合有甲基丙烯酰基(methacryloyl group, MAO)的改性微球 MAO-HEMA/NVP. 在装有回流冷凝器、搅拌器与温度计的四口烧瓶中,将改性微球 MAO-HEMA/NVP 在水溶剂中浸泡溶胀后,加入单体甲基丙烯酸与引发剂过硫酸铵,于 70 °C 的恒温且在氮气保护的条件下,进行接枝聚合反应 12 h,将产物微球在索氏抽提器中用无水乙醇抽提 24 h,以除去物理吸附在微球表面的聚合物,然后真空干燥,得到接枝微球 PMAA-HEMA/NVP.

采用 KBr 压片法测定接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 的傅立叶变换红外(FTIR)光谱;使用扫描电子显微镜(SEM)观察微球的形貌<sup>[22]</sup>;酸碱滴定法(溶胀-回滴法)测定接枝微球表面 PMAA 的接枝度(GD, g·g<sup>-1</sup>),通过控制接枝聚合反应时间,制备了接枝度系列变化的接枝微球 PMAA-HEMA/NVP;采用电泳法测定接枝微球的 zeta 电位:将接枝微球研磨,加入到二次蒸馏水中,构成悬浮有细小颗粒的水分散体系,系列地调整与改变分散体系的 pH 值,使用电泳仪测定不同 pH 值条件下微球的 zeta 电位,绘制 zeta 电位-pH 关系曲线,即接枝微球的 zeta 电位曲线.

### 1.3 接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对溶菌酶的吸附实验

#### 1.3.1 吸附动力学实验

于若干个 50 mL 的具塞锥形瓶中分别移取 10 mL 二次蒸馏水,加入准确称取的质量约为 0.1 g 的接枝微球 PMAA-HEMA/NVP,浸泡 3 h 后,再分别移取 10 mL 浓度为 2 g·L<sup>-1</sup> 的溶菌酶溶液,然后在振荡器中恒温振荡,分别在不同时间取出,离心分离,用紫外分光光度计法(λ=280 nm)测得上清液中溶菌酶的浓度,计算溶菌酶的吸附量,绘制吸附量-时间的吸附动力学曲线,确定吸附达到平衡的时间.由于接枝微球已溶胀浸泡 3 h,接枝的 PMAA 已充分舒展,羧基已充分暴露,因此溶菌酶扩散阻力较小,可较快地扩散至吸附位点.测定结果表明,吸附达到平

衡的时间较短,为 5 h.

#### 1.3.2 等温吸附实验

在 0.4–2.4 g·L<sup>-1</sup> 范围内配制浓度系列变化的溶菌酶水溶液,于若干个 50 mL 的具塞锥形瓶中分别移取 10 mL 二次蒸馏水,加入准确称取的质量为 0.1 g 的接枝微球 PMAA-HEMA/NVP(接枝度为 0.196 g·g<sup>-1</sup>),浸泡 3 h 后,分别加入 10 mL 浓度不同的溶菌酶溶液,在振荡器中恒温振荡 5 h,离心分离,用紫外分光光度计法(λ=280 nm)测得上清液中溶菌酶的浓度,采用(1)式计算溶菌酶的平衡吸附量,绘制等温吸附线.

$$Q_e = \frac{V(c_0 - c_e)}{m} \quad (1)$$

式中,  $Q_e$  为平衡吸附量(mg·g<sup>-1</sup>);  $V$  为溶液体积(mL);  $c_0$  为溶菌酶溶液的初始浓度(g·L<sup>-1</sup>);  $c_e$  为溶菌酶平衡浓度(g·L<sup>-1</sup>);  $m$  为接枝微球的质量(g).

#### 1.3.3 各种因素对溶菌酶-接枝微球体系吸附作用的影响

为了探索接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对溶菌酶的吸附机理,使用不同 pH 值范围内的稀的缓冲溶液配制溶菌酶水溶液,进行等温吸附;采用接枝度系列变化的接枝微球进行等温吸附;在溶菌酶溶液中加入电解质 NaCl,并系列地改变 NaCl 的浓度,进行等温吸附.深入地考察了介质 pH 值、微球接枝度及离子强度对溶菌酶-接枝微球体系吸附作用的影响规律.

## 2 结果与讨论

### 2.1 接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 与溶菌酶的化学结构

首先以 HEMA 与 NVP 为主单体,以 MBA 为交联剂,采用反相悬浮聚合法制备了交联微球 HEMA/NVP,其化学结构示于图 1. 交联微球 HEMA/NVP 表面含有大量羟基,使甲基丙烯酰氯与微球表面的羟基反应,将可聚合双键引入微球表面,制得改性微球 MAO-HEMA/NVP;最后以过硫酸铵为引发剂,采用逐步接枝的方法,使甲基丙烯酸在微球表面进行接枝聚合,制得接枝微球 PMAA-HEMA/NVP,其化学结构也示于图 1. 显然,接枝微球表面含有高密度的羧基,是一种功能聚合物微球.

溶菌酶是由 129 个氨基酸残基组成的碱性球蛋白,含有 19 个带正电荷的氨基酸残基,14 个带负电荷的氨基酸残基<sup>[23]</sup>,其等电点在 pH=11 左右,其折叠模式如图 2 所示.

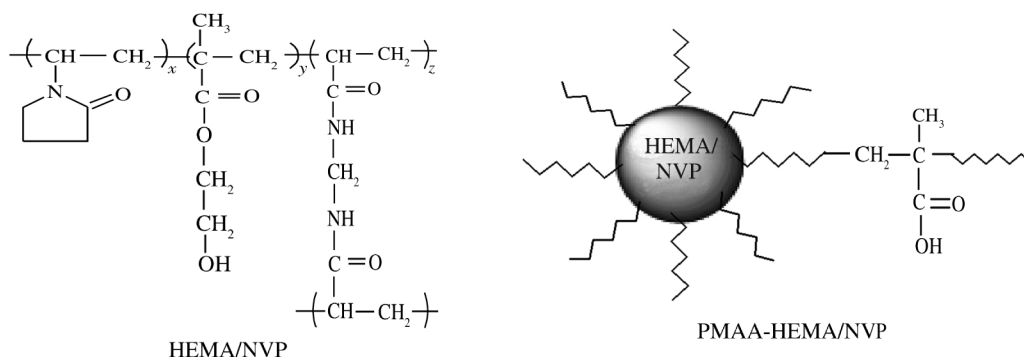


图1 交联微球 HEMA/NVP 与接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 的化学结构

Fig.1 Chemical structures of crosslinked microspheres HEMA/NVP and grafted microspheres PMAA-HEMA/NVP

## 2.2 接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 的 zeta 电位

为了深入分析接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对溶菌酶的吸附机理,使用电泳仪分别测定了交联微球 HEMA/NVP 与接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 的 zeta 电位,测定结果示于图 3.从图 3 可清楚地看到:(1)交联微球 HEMA/NVP 的 zeta 电位为负值,但数值很小;(2)在交联微球 HEMA/NVP 表面接枝聚电解质 PMAA,从而形成接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 后,zeta 电位发生了很大的变化,在很大的 pH 值范围内,zeta 电位为绝对值很大的负值,意味着接枝微球表面带有高密度的负电荷,这是由于接枝大分子 PMAA 的羧基侧基的电离作用所导致的;(3)在  $\text{pH} < 2$  时,接枝微球的 zeta 电位会转变为正值,其可能的原因是在强酸性溶液中,一方面羧酸的电离受到抑制,另一方面微球表面的双电层受到压缩,过多的反离子( $\text{H}^+$ )进入紧密层,使微球的 zeta 电位发生了根本性的转变.

## 2.3 接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对溶菌酶的等温吸附行为与吸附机理

### 2.3.1 两种聚合物微球对溶菌酶的等温吸附

分别使用交联微球 HEMA/NVP 与接枝微球

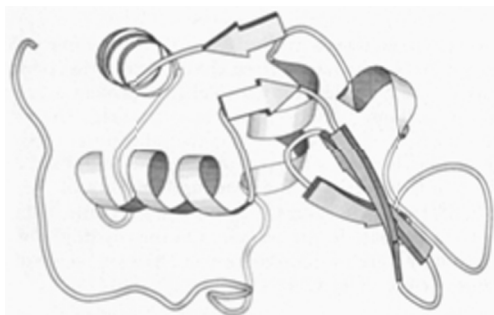


图2 溶菌酶球蛋白的折叠模式<sup>[23]</sup>

Fig.2 Folding pattern of lysozyme<sup>[23]</sup>

PMAA-HEMA/NVP(接枝度为  $0.196 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ),在相同条件下对溶菌酶进行了等温吸附,图 4 给出了等温吸附线.从图 4 中看出:(1)接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对溶菌酶具有很强的吸附作用;(2)等温吸附线基本具有 Langmuir 等温吸附模式的特征,即为单分子层吸附(后面将看到不符合 Langmuir 等温吸附模式的情形);(3)交联微球 HEMA/NVP 对溶菌酶也具有一定的吸附能力.

如前所述,溶菌酶是碱性蛋白,即在一般的 pH 条件下,其多肽链带有正电荷,而接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 表面带有高密度的负电荷,在强烈的静电相互作用(吸引)下,接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 必然对溶菌酶产生强吸附作用.因此,静电相互作用是接枝微球对溶菌酶吸附的主驱动力.图 4 显示,交联微球 HEMA/NVP(其 zeta 电位很小)对溶菌酶也具有一定的吸附能力,显然静电相互作用(吸引)不是接枝微球对溶菌酶吸附的唯一的驱动力,作者认

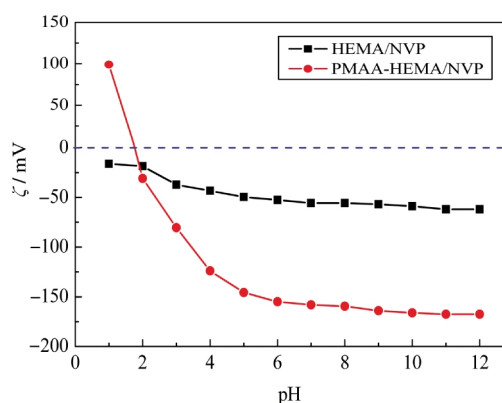


图3 HEMA/NVP 与 PMAA-HEMA/NVP 微球的 zeta 电位( $\zeta$ )随 pH 的变化曲线

Fig.3 Curves of zeta potentials ( $\zeta$ ) of HEMA/NVP and PMAA-HEMA/NVP microspheres with pH value

为这是疏水相互作用与氢键作用使然. 交联微球 HEMA/NVP 表面含有大量羟基, 与溶菌酶的氨基酸残基之间可产生氢键相互作用; 交联微球 HEMA/NVP 表面具有一定的疏水性, 与溶菌酶多肽链中氨基酸残基的疏水部分之间可产生疏水相互作用, 这两种次价键力对溶菌酶的吸附也是有贡献的<sup>[24-25]</sup>. 在接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 与溶菌酶之间也存在着这两种次价键力. 因此, 接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对溶菌酶的吸附机理应该是: 在强烈的静电相互作用(主驱动力)下, 并在疏水相互作用的协同下, 溶菌酶被吸附至微球表面, 其氨基酸残基则进一步与接枝微球的羧基等基团产生氢键相互作用, 导致高的吸附容量.

2.3.2 接枝度不同的接枝微球对溶菌酶的等温吸附

使用接枝度不同的接枝微球 PMAA-HEMA/NVP, 在相同条件下对溶菌酶进行等温吸附, 图 5 给出了等温吸附线. 图 5 显示, 随着接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 接枝度的增大, 对溶菌酶的吸附容量迅速增大. 这是由于接枝度大的微球, 其表面羧基含量大, 表面的负电荷密度大, 对溶菌酶的静电吸引力强, 导致高的吸附容量. 图 5 的实验结果再次表明接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对溶菌酶吸附的主驱动力是静电相互作用.

2.3.3 存在静电排斥作用时的等温吸附

将溶菌酶水溶液的 pH 值分别调节至 pH=1 与 pH=12, 在两种 pH 条件下, 使用接枝微球 PMAA-HEMA/NVP(接枝度为 0.196 g·g<sup>-1</sup>)对溶菌酶进行了等温吸附, 图 6 给出了等温吸附线.

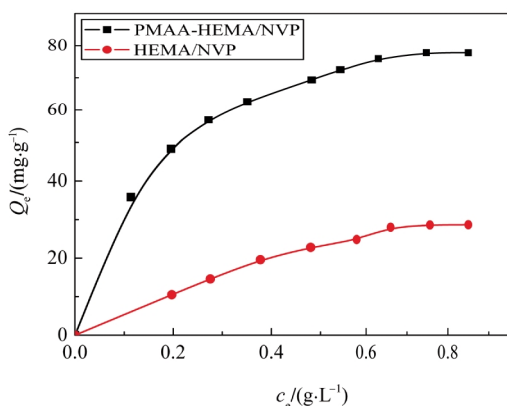


图 4 两种聚合物微球对溶菌酶的等温吸附线  
 Fig.4 Adsorption isotherms of two kinds of polymeric microspheres for lysozyme  
 T=35 °C; pH=8; c<sub>e</sub>: equilibrium concentration; Q<sub>e</sub>: equilibrium adsorption amount

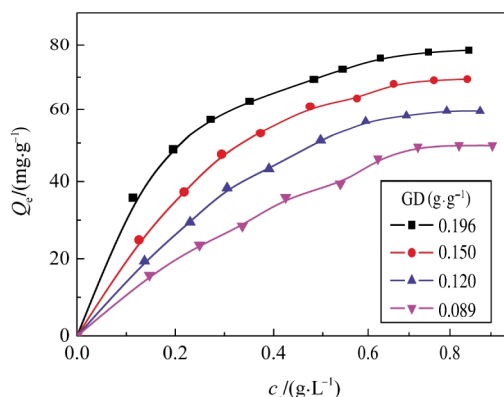


图 5 接枝度不同的接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对溶菌酶的等温吸附线  
 Fig.5 Adsorption isotherms of grafted microspheres with different grafting degrees for lysozyme  
 T=35 °C; pH=8; GD: grafting degree

当 pH=1 时, 接枝微球表面携带正电荷(见图 3), 接枝微球与带正电荷的溶菌酶分子之间存在着静电排斥作用, 但图 6 显示, 此时接枝微球对溶菌酶仍有一定的吸附作用(尽管吸附容量很低); 当 pH=12 时, 溶菌酶分子带有负电荷, 表面带负电荷的接枝微球与溶菌酶分子之间也存在着静电排斥作用, 但图 6 显示, 此时接枝微球对溶菌酶也有一定的吸附作用(尽管吸附容量很低). 上述两种情况表明, 接枝微球与溶菌酶分子之间即使存在静电排斥作用, 也会产生吸附作用, 与文献所报道的结果<sup>[26]</sup>相一致. 为什么会发生此现象呢? 这是由如上所分析的吸附机理所决定的, 接枝微球与溶菌酶分子之间存在的疏水相互作用与氢键作用, 导致了上述现象的发生.

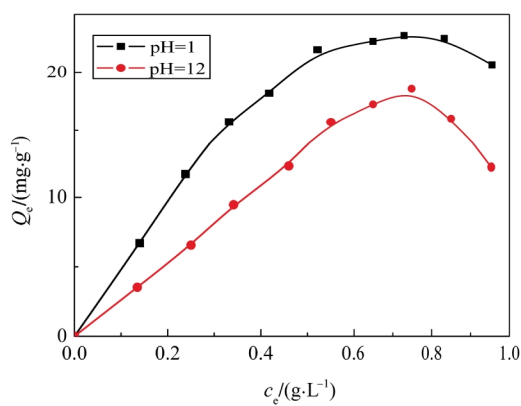


图 6 在 pH=1 与 pH=12 时接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对溶菌酶的等温吸附线  
 Fig.6 Adsorption isotherms of grafted microspheres for lysozyme at pH 1 and pH 12  
 T=35 °C



从图 6 还发现, 在吸附容量低的这两种情况下, 且当溶菌酶的浓度较高时, 等温吸附曲线上出现了最高点, 随后吸附量又降低, 偏离了 Langmuir 等温吸附模式, 这可能是由表面吸附诱导的溶菌酶自聚集(或自缔合)所造成的. 溶菌酶是一种易发生自缔合(self-associate)的蛋白质, 这种自缔合过程易被界面吸附所促进<sup>[27-28]</sup>. 作者认为溶液中溶菌酶自聚集与在微粒表面的吸附过程, 实际是一对竞争过程. 当溶液中溶菌酶浓度较高, 且表面吸附又较少时, 在表面吸附的诱导作用下, 溶液中的溶菌酶就会发生自聚集, 从而导致在等温吸附线上出现最高点后, 吸附容量又下降的现象(下面图 7 中的某些曲线也有类似规律).

#### 2.4 介质 pH 值对吸附作用的影响

系列地调节溶菌酶水溶液的 pH 值, 使用接枝微球 PMAA-HEMA/NVP(接枝度为  $0.196 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 在不同 pH 条件下对溶菌酶进行了等温吸附, 图 7 给出了等温吸附线. 为更清楚地显示 pH 值对吸附作用的影响, 从图 7 中取平衡浓度为  $0.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  所对应的平衡吸附量数据  $Q_e$ . 绘制  $Q_e$ -pH 关系曲线, 如图 8 所示.

从图 7 与图 8 中可以发现, 随着介质 pH 值的增大, 接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对溶菌酶的吸附容量呈现先增大后减小的规律, 在 pH=9 时(溶菌酶等电点附近)出现最大的吸附容量( $90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 这与文献中报道的研究结果<sup>[22,29]</sup>相一致. 吸附容量随 pH 值变化且在等电点附近出现最大吸附容量的现象, 是蛋白质分子在固体表面吸附时显现的一般性规律<sup>[29-31]</sup>. 对于本体系, 其可能的原因是: 当 pH 较低

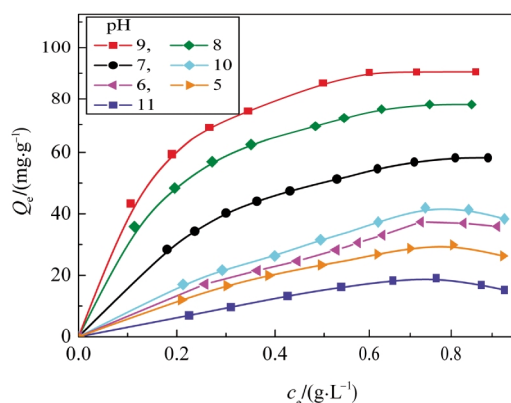


图 7 在不同 pH 下接枝微球对溶菌酶的等温吸附线  
Fig.7 Adsorption isotherms of grafted microspheres for lysozyme at different pH values

$T=35 \text{ }^\circ\text{C}$

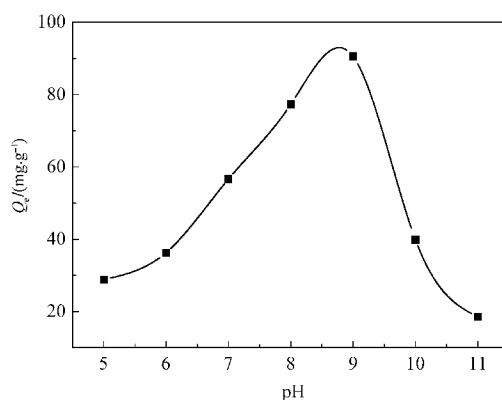


图 8 pH 值对吸附容量的影响  
Fig.8 Effect of pH value on adsorption capacity

时(约为 5), 溶菌酶分子的正电性很强(碱性氨基酸残基中 N 原子的质子化程度高), 且接枝微球表面的负电性也很强(见图 3), 此时, 接枝微球与溶菌酶分子之间的静电吸引力应该是很强的, 但是, 吸附在接枝微球表面相邻的溶菌酶分子之间的静电排斥作用很强<sup>[29]</sup>, 导致低的吸附容量; 随着介质 pH 值的增大, 溶菌酶分子的正电性减弱, 吸附在接枝微球表面的溶菌酶分子之间的静电排斥作用减弱, 故吸附容量增大; 在溶菌酶等电点附近的 pH 条件下, 由于溶菌酶分子的净电荷为零, 微球表面相邻溶菌酶分子之间不再存在静电排斥作用, 此时吸附层的结构最为密实, 达到了最高的吸附容量<sup>[29]</sup>; 越过最高点, pH 值再增大时, 由于溶菌酶分子电性能的转变, 接枝微球表面与溶菌酶分子之间产生了静电排斥作用, 因而吸附容量转而下降. 有的吸附体系,  $Q_e$ -pH 关系曲线上的最高点处的 pH 值正好是溶菌酶的等电点<sup>[30]</sup>; 有的吸附体系, 则最高点处的 pH 值与溶菌酶的等电点稍有偏离(比等电点低). 有研究者认为, 此时最高点处的 pH 值是溶菌酶-吸附剂分子复合物的等电点<sup>[29]</sup>, 而本文作者则将此 pH 值称为溶菌酶的表现等电点(因在 pH 值较高时, 体系中的小离子可能吸附至溶菌酶球蛋白表面, 导致溶菌酶等电点的改变<sup>[31]</sup>). 因此, 对于本研究体系, pH=9 的值, 或者可以认为是溶菌酶-PMAA 复合物的等电点, 或者可以认为是该研究体系中溶菌酶的表现等电点.

#### 2.5 离子强度对吸附作用的影响

分别在  $\text{pH} < 9$  与  $\text{pH} > 9$  的溶菌酶溶液中, 加入电解质 NaCl, 并系列地改变 NaCl 的浓度, 考察了两种情况下离子强度对吸附作用的影响, 图 9 与图 10 分别为两种情况下不同盐度时接枝微球对溶菌酶的等温吸附线.

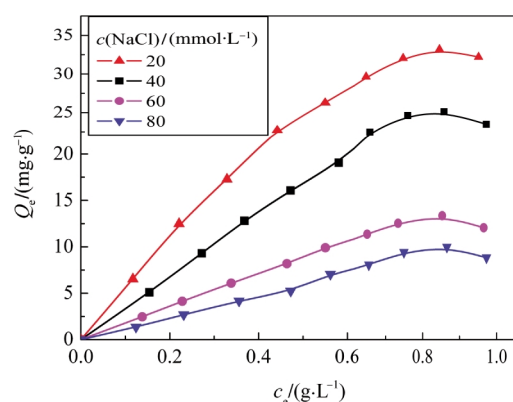


图9 在 pH=6 时不同盐度下接枝微球对溶菌酶的等温吸附线

Fig.9 Adsorption isotherms of grafted microspheres for lysozyme with different salinities at pH 6  
T=35 °C

在由静电作用为主驱动力的蛋白质吸附体系的研究中,人们一般认为,电解质的加入,或离子强度的增大会引起吸附容量的减小<sup>[32]</sup>.本研究分别在 $Q_e$ -pH 关系曲线上最高点(pH=9)两侧的 pH 范围内,考察了离子强度对吸附容量的影响,发现了有趣的现象:在 pH=9 两侧的 pH 范围内,离子强度对吸附作用的影响正好是相反的;当 pH<9 时,离子强度抑制吸附;当 pH>9 时,离子强度促进吸附.

由图 9 可以看出,当 pH=6(pH<9)时,NaCl 浓度越高,吸附容量越小.这是由于电解质离子对接枝微球与溶菌酶之间静电相互作用力屏蔽的结果.在 pH<9 的水介质中,接枝微球与溶菌酶分子之间静电相互作用为吸引力,电解质 NaCl 的加入,其阴离子(Cl<sup>-</sup>离子)构成的离子氛对溶菌酶分子的正电荷会产生屏蔽作用,同时,其阳离子(Na<sup>+</sup>离子)会强烈地影

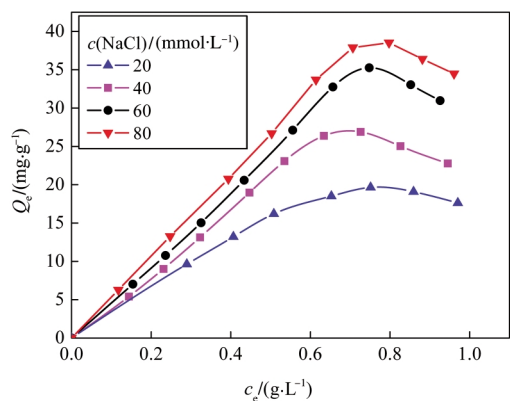


图 10 在 pH=11 时不同盐度下接枝微球对溶菌酶的等温吸附线

Fig.10 Adsorption isotherms of grafted microspheres for lysozyme with different salinities at pH 11  
T=35 °C

响接枝微球表面的双电层,减弱其 zeta 电位,两者都会削弱接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对溶菌酶的吸附作用,故吸附容量随溶液盐度的增大而下降.

由图 10 可以看出,当 pH=11(pH>9)时,NaCl 浓度越高,吸附容量越大.在 pH>9 的水介质中,接枝微球与溶菌酶分子之间静电相互作用可能已转变为排斥力(溶菌酶分子的表观等电点为 9),类似于上面所述的原理,吸附容量之所以增大,同样是由于电解质离子对接枝微球与溶菌酶之间静电排斥力屏蔽与削弱的结果.

对于本文所得到的上述若干研究结果,其微观机理还需作进一步的探究;另外,在吸附过程中溶菌酶的构象是否发生变化,pH 与离子强度的变化对溶菌酶的物理化学性质会产生什么样的影响,这些问题都有待深入研究.

### 3 结论

接枝有聚甲基丙烯酸的接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对碱性蛋白具有很强的吸附作用,其基质材料又具有生物相容性,可望在血液灌流的血液净化治疗中,用作去除低密度脂蛋白(LDL)的吸附材料.接枝微球 PMAA-HEMA/NVP 对模型碱性蛋白溶菌酶的强吸附作用,其主驱动力是静电相互作用,同时,疏水相互作用与氢键作用也发挥一定的作用.介质的 pH 值对体系的吸附性能有很大的影响,随着 pH 的增大,接枝微球对溶菌酶的吸附容量呈现先增大后减小的规律,当 pH=9 时,吸附容量最大.本研究发现,以 pH=9 为分界,离子强度对体系的吸附性能产生相反的影响,当 pH<9 时,离子强度抑制吸附;当 pH>9 时,离子强度促进吸附.

### References

- Li, Y.; Neoh, K. G.; Kang, E. T. *J. Colloid Interf. Sci.*, **2004**, **275**: 488
- Galisteo, F.; Norde, W. *Colloid. Surf. B-Biointerfaces*, **1995**, **4**: 375
- Tsukagoshi, T.; Kondo, Y.; Yoshino, N. *Colloid. Surf. B-Biointerfaces*, **2007**, **54**: 101
- Martinez, F.; Martin, A.; Pradanos, P.; Calvo, J. I.; Palacio, L.; Hernandez, A. *J. Colloid Interf. Sci.*, **2000**, **221**: 254
- Wang, H.; Wang, J.; Choi, D.; Tang, Z. W.; Wu, H.; Lin, Y. H. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, **24**: 2377
- Xue, W. C.; Bandyopadhyay, A.; Bose, S. *Acta Biomater.*, **2009**, **5**: 1686
- Shao, D. D.; Xu, K. K.; Song, X.; Hu, J. H.; Yang, W. L.; Wang,

- C. C. J. *Colloid Interf. Sci.*, **2009**, **336**: 526
- 8 Bayramoglu, G.; Yilmaz, M.; Senel, A. Ü.; Arica, M. Y. *Biochem. Eng. J.*, **2008**, **40**: 262
- 9 Zhang, Y. Y.; Fung, Y. S.; Sun, H.; Zhu, D. R.; Yao, S. Z. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, **2005**, **108**: 933
- 10 Stegmayr, B. G. *Transfus. Apheresis Sci.*, **2005**, **32**: 209
- 11 Wang, S. Q.; Yu, Y. T.; Cui, T.; Cheng, Y. *Biomaterials*, **2003**, **24**: 2799
- 12 Cheng, Y.; Wang, S. Q.; Yu, Y. T.; Yuan, Y. *Biomaterials*, **2003**, **24**: 2189
- 13 Fu, G. Q.; Li, H. Y.; Yu, H. F.; Liu, L.; Yuan, Z.; He, B. L. *React. Funct. Polym.*, **2006**, **66**: 239
- 14 Guowei, D.; Adriane, K.; Chen, X. Z.; Jie, C.; Liu, Y. F. *Int. J. Pharm.*, **2007**, **328**: 78
- 15 Wan, L. S.; Xu, Z. K.; Huang, X. J.; Huang, X. D.; Yao, K. *Acta Biomater.*, **2007**, **3**: 183
- 16 Tomića, S. L. J.; Mičić, M. M.; Filipović, J. M.; Suljovrujić, E. *H. Radiat. Phys. Chem.*, **2007**, **76**: 1390
- 17 Yu, B.; Wang, C.; Ju, Y. M.; West, L.; Harmon, J.; Moussy, J. Y.; Moussy, F. *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, **23**: 1278
- 18 He, H. Y.; Cao, X.; Lee, L. J. *J. Control. Release*, **2004**, **95**: 391
- 19 Müller-Schulten, D.; Hodenius, M. *Radiat. Phys. Chem.*, **2002**, **63**: 513
- 20 Nho, Y. C.; Kwon, O. H. *Radiat. Phys. Chem.*, **2003**, **66**: 299
- 21 Mirzadeh, H.; Katbab, A. A.; Khorasani, M. T.; Burford, R. P.; Gorgin, E.; Golestani, A. *Biomaterials*, **1995**, **16**: 641
- 22 Fu, H. Y.; Gao, B. J. *Chemistry*, **2009**, **72**: 1108 [付红艳, 高保娇. 化学通报, **2009**, **72**: 1108]
- 23 Galisteo, F.; Norde, W. J. *Colloid Interf. Sci.*, **1995**, **172**: 502
- 24 Feng, Z. C.; Shao, Z. Z.; Yao, J. R.; Huang, Y. F.; Chen, X. *Polymer*, **2009**, **50**: 1257
- 25 Matsumura, H.; Saburi, M. *Colloid. Surf. B-Biointerfaces*, **2006**, **47**: 146
- 26 Kandori, K.; Horigami, N.; Kobayashi, H.; Yasukawa, A.; Ishikawa, T. *J. Colloid Interf. Sci.*, **1997**, **191**: 498
- 27 Daly, S. M.; Przybycien, T. M.; Tilton, R. D. *Colloid. Surf. B-Biointerfaces*, **2007**, **57**: 81
- 28 Ethève, J.; Déjardin, P.; Boissière, M. *Colloid. Surf. B-Biointerfaces*, **2003**, **28**: 285
- 29 Vander Veen, M.; Norde, W.; Stuart, M. C. *Colloid. Surf. B-Biointerfaces*, **2004**, **35**: 33
- 30 Shamim, N.; Liang, H.; Hidajat, K.; Uddin, M. S. *J. Colloid Interf. Sci.*, **2008**, **320**: 15
- 31 Su, T. J.; Lu, J. R.; Thomas, R. K.; Cui, Z. F.; Penfold, J. J. *Colloid Interf. Sci.*, **1998**, **203**: 419
- 32 Bayramoğlu, G.; Ekici, G.; Beşirli, N.; Arica, M. Y. *Colloid. Surf. A- Physicochem. Eng. Aspects*, **2007**, **310**: 68