

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

高分子薄膜於外加電場下應用於血漿蛋白質分離之研究

計畫編號：89-2314-B-002-259-

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：林東燦 國立台灣大學醫學院檢驗醫學科

共同主持人：楊台鴻 國立台灣大學醫學院醫學工程研究所

一、中文摘要

過去實驗已證實自製之高分子薄膜於分離免疫球蛋白及白蛋白之可行性，惟其間發現分離之效果未臻理想之最大原因為蛋白質在薄膜表面形成一層濾餅(cake)，為改進此缺失，本實驗乃以掃流過濾及外加電場，以期藉流動性溶液及電場使免疫球蛋白不致沉積在薄膜表面，阻塞過濾效果，以便白蛋白通過薄膜，如此將可達到預期的效果。故本實驗分為三部分：(1) 薄膜結構之鑑定包括薄膜之表面，截面，孔隙度大小之測定(2) 蛋白質溶液在外加電場掃流之過濾實驗及(3) 血液檢體於同樣狀況下之測試。希望此外加電場掃流之簡易裝置能徹底改善過去因阻塞造成阻力增加，導致過濾效果降低之缺失，使此高分子薄膜能作為臨床上治療性血漿分離時二次過濾之用。

關鍵詞：蛋白質分離、高分子薄膜、電場

Abstract

Previous experiments have proved that membranes have the possibility to separate of globulins and albumin. From these experiments, we found the pitfall causing the lower filtration efficiency is due to the "cake" formation on the membranes. In order to improve this pitfall, we try to add an electric field and cross-flow to the experiments. As we know, the anode will attract the negative-changed globulins with the cross-flow that will prevent the obstruction of the micropores. By the way, the cross-flow will simulate the condition of cascade filtration by its continuous flow. So, three parts will compose the studies: 1) Identification of membrane structures including surface and cross-section, measuring size of the micropores, contact angles and degree of crystallization. 2) Experiments of protein

solutions filtered through membranes within a cross-flow device under electric field. 3) Experiments of plasma of different composition filtered through membranes under the same conditions of above. We hope this simple cross-flow and electric field design will improve the filtration efficacy and let the membrane can be used clinically in cascade or double filtration technique in therapeutic plasmapheresis.

Keywords: protein separation, membrane, electric field

二、計畫緣由與目的

由於血漿交換實際存在著許多之缺點，故有其他替代方法的想法，其基本概念是利用薄膜過濾的方法，將血液中過多或發生病變之蛋白質與其他蛋白質分離，留下有用之蛋白質，即可免除血漿交換之缺點。1980年，Agishi et al. 提出分段過濾(cascade filtration or double filtration)之構想[1]：先將血液經初次過濾(primary filtration)，分離出血漿及血球；再取血漿進行二次過濾(secondary filtration)，將免疫球蛋白或免疫複合體等較大之溶質與白蛋白等其它較小之溶質分離，而達到以上之目的，由於免疫球蛋白與白蛋白具有指標作用，故在分離過程中，分離免疫球蛋白與白蛋白為最關鍵之步驟[2-4]。若就薄膜本身性質而言，影響過濾特性最鉅者就是其孔隙度，包含薄膜的孔隙大小與分佈等為影響薄膜過濾特性的重要因素。

本計畫的研究方向是朝利用薄膜

進行分離血漿蛋白質的方向進行，在分離過程中將免疫球蛋白盡可能去除，而盡可能將其他有用之蛋白質留下。所用的高分子薄膜材料為乙烯-乙醇共聚合物 (poly (ethylene-co-vinylalcohol))，由於其血液適合性佳 [5-7]，目前已廣泛應用於血液透析，且效果良好 [8]；此材料具有結晶性，皆可利用其結晶性製備微孔型 (microporous) 薄膜，故過濾時流通率較大。

依過去實驗，在薄膜進行分離血漿蛋白質的主要缺點是蛋白質會在薄膜表面形成一層濾餅 (cake)，使薄膜在操作過程中過濾功能會逐漸衰退，此種現象又特別會發生在分離高濃度的溶液時，一般在以薄膜濃縮蛋白質時亦有類似的問題，文獻上解決此問題的方法則常在過濾時外加電場 [9-12]，亦即利用蛋白質的帶電特性，在特定電場下，使蛋白質懸浮於溶液中，而不會在薄膜表面形成一層濾餅，因此濾液的流通量可加大。

三、實驗結果與討論

薄膜結構：本研究所製備之薄膜分為兩大類：非對稱性薄膜與顆粒型薄膜。圖 1(a) 為顆粒型薄膜 (E1 膜) SEM 照片，可發現薄膜是由大小相同顆粒所堆積而成的結構，顆粒半徑約為 $0.4 \mu\text{m}$ ，其為使用濕製程且利用正辛醇為凝聚劑，外觀呈略微透明，且強度較差。圖 1(b) 為非對稱型性薄膜 (E2 膜)，包含緻密的皮層與孔洞結構，孔洞的形態為手指形結構，其外觀則呈現不透明之乳白色，且強度較好。薄膜之孔隙度主要可由水銀測孔儀量測，經理論計算可計算出薄膜之整體孔隙度，如表 1 所示。

純蛋白質溶液外加電場掃流過濾實驗：首先要設計一個可外加電場的

掃流過濾裝置 (見圖 2)，將純蛋白質溶液以幫浦送到過濾裝置的入口，薄膜上下方各有金屬外接直流電源形成陰陽兩極，濾液穿過薄膜從下方流回蛋白質溶液槽，重複循環過濾，未穿過薄膜的溶液則自裝置出口流出排掉，經過多組實驗發現將電壓固定於 3 volt，即電場強度為 $273(\text{V}/\text{m})$ 可有效的增加濾液的流通量，如圖 3 所示，但若電場超過此值則蛋白質則有變質之虞；至於蛋白質溶液濃度選用的條件和人體內血液中蛋白質濃度相同 ($4.0 \text{g}/\text{dl}$)；而過濾壓力依不同薄膜強度做調整，以達到最佳流通量。另外由濾過液之蛋白質濃度，發現顆粒型薄膜 (E1) 均可使白蛋白通過，而非對稱型性薄膜 (E2 膜) 則因為其表層有一皮層，故阻擋了白蛋白的通過。

血液檢體測試：表 2 表示，使用免疫球蛋白過高之血漿進行超過濾實驗之結果，操作壓力為 $0.5 \text{kgf}/\text{cm}^2$ 。由表中可知，在血漿超過濾實驗結果中，E2 薄膜完全阻隔免疫球蛋白的通過，但同時也阻隔了白蛋白的穿透，用於血漿分離時，是不理想的薄膜。在顆粒型 E1 薄膜，白蛋白可穿透，免疫球蛋白也有部份穿透。而在實際的應用上，對於薄膜之要求為白蛋白穿透愈多、免疫球蛋白愈少愈好，因此定義一個白蛋白和免疫球蛋白兩者間的比值， A/G ，此值愈大代表薄膜愈能符合要求，另外，由圖 4 中，於流速達穩定狀態 (Steady State) 再外加電場 $273 \text{V}/\text{m}$ ，確實可以使流速增加，但對過濾的組成沒有幫助，其原因可能其只是破壞濾餅 (cake)，而沒有改變薄膜的孔隙度。

因此，非對稱性薄膜中同時阻隔了免疫球蛋白與白蛋白的通過，所以無法應用於血漿分離上，而顆粒型薄膜為本研究中

應用於血漿分離較佳之選擇。

四、計畫成果自評

本計畫的目的是要探討高分子薄膜於外加電場下應用於血漿蛋白質分離的可行性，將薄膜分離技術應用免疫球蛋白與白蛋白的分離，以高分子薄膜為研究對象，完成之工作項目有鑑定薄膜的結構，量測薄膜之孔隙度及表面性質。設計外加電場的掃流過濾裝置，建立實驗量測蛋白質穿透薄膜的情形。研究蛋白質與膜材間的作用力，並改善蛋白質阻塞膜材的情形。取人體血液檢體進行實際操作，測試薄膜進行於外加電場下應用於血漿蛋白質分離的可行性。

五、參考文獻

1. Agishi T, Kaneko I, Hasuo Y et al, Double filtration plasmapheresis, *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 26, 406-409, 1980.
2. J. Honiger, P. Ballardur, P. Mariani, Y. Calmus, M. Vanbourdolle, R. Delelo, J. Capean, and B. Nordlinger, Permeability and biocompatibility of new hydrogel used for encapsulation of hepatocytes, *Biomaterials*, 16(10), 753-759, 1995.
3. T. Aung, M. Kogire, K. Inoue, T. Fujisato, Y. Gu, K. Burczak, S. Shinohara, M. Mitsuo, S. Maetani, Y. Ikada, and T. Tobe, Insulin release from a bioartificial pancreas using a mesh reinforced polyvinyl alcohol hydrogel tube, *ASAIO Journal*, 93-96, 1993.
4. S. J. Sullivan, T. Maki, K. M. Borland, M. D. Mahoney, B. A. Solomon, T. E. Muller, A. P. Monaco, and W. L. Chick, Biohybrid artificial pancreas: Long-term implanatation studies in diabetic, pancreatectomized dogs, *Science*, 252, 718-721, 1991.
5. A. C. Hauser, K. Derfler, F.

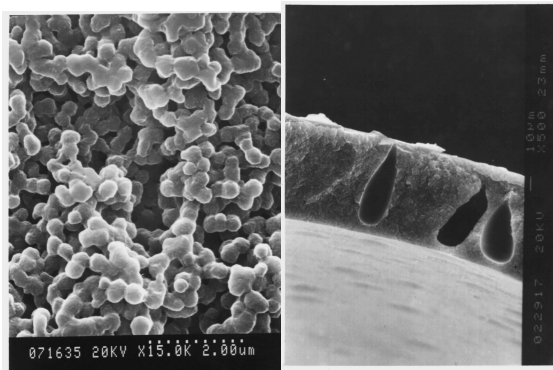
Stockenhuber, O. Janata, and P. Balcke, *Clinical Science*, 79, 471-476, 1990.

6. H. Naito, Non-anticoagulant hemodialysis using EVAL hollow fiber membrane dialyzer, Kuraray Co., Ltd.
7. H. Naito and T. Noguchi, *Japanese J. of Artificial Organs*, 12, 642-645, 1983
8. Yutaka S, Akinori S, and Masara S, Blood purification device using membranes derived from poly(vinyl alcohol), and copolymer of ethylene and vinyl alcohol, *Polymer Journal*, 19(5), 501-513, 1987
9. Singh, Rajindar; Development and design of advanced membrane systems *CHEMTECH* 26, 6, (Jun, 1996)
10. Akay, G.; Wakeman, R.J Electric field intensification of surfactant mediated separation processes, *Chemical Engineering Research & Design, Part A: Transactions of the Institute of Chemical Engineers* 74, A5, (Jul, 1996)
11. E. Iritani, K. Ohashi, T. Murase, Analysis of filtration mechanism of dead-end electro-ultrafiltration for proteinaceous solutions, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 25 (1992), 383-388.
12. H. Yukawa, K. Shimura, A. Suda, A. Manwia, Cross flow electro-ultrafiltration for colloidal solution of protein, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 16 (1983) 305-311.

表1：高分子薄膜之孔隙度

薄膜種類	Median Volume pore Diameter (μm)	Median Area pore Diameter (μm)	平均孔徑 (μm)	體密度 (g/ml)	Apparent density (g/ml)
E1	0.3618	0.0054	0.0377	0.6310	1.3303
E2	0.0541	0.0179	0.0318	0.8009	0.9879

圖 1：薄膜之 SEM 表面及淬斷面結構照片



(a) (b)

圖 2：過濾裝置簡圖

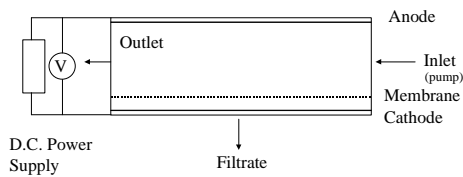


圖 3：不同電場下，蛋白質濾過液流速對時間作圖

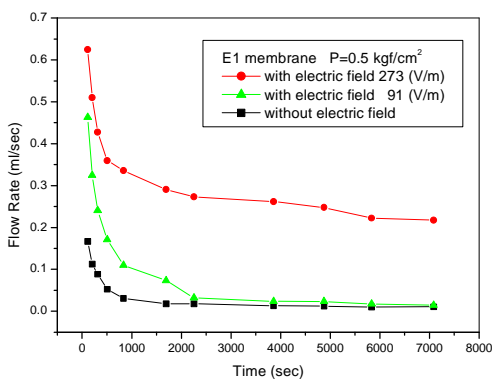


圖 4：血漿過濾過程中當流速達穩定狀態 (Steady State) 外加一電場 273 V/m 之表現

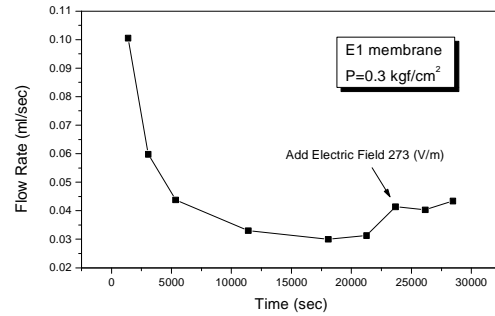


表 2 血漿電場超過濾之濾過液濃度組成 (免疫球蛋白濃度過高之血漿)

溫度 25 °C，操作壓力 0.5 kgf/cm²

原液組成: Alb=2.5 g/dl IgG=7.1 g/dl

E1 membrane			
	Alb. (g/dl)	IgG (g/dl)	A/G
Origin	2.5	7.1	0.35
10 ml	0.5	1.3	0.38
20 ml	0.8	1.2	0.67
30 ml	0.9	0.7	1.29
40 ml	0.8	0.7	1.14
50 ml	0.8	0.7	1.16
60 ml	0.7	0.6	1.18
70 ml	0.8	0.6	1.33
80 ml	0.7	0.6	1.19

Alb = Albumin ; IgG = Immunoglobulin G.

正常人體血漿中，Alb = 4.0 g/dl，IgG = 800 ~ 1600 mg/dl