

# 牛血清蛋白磁性壳聚糖微球谷氨酸改性吸附

万威, 李林强\*, 王瑞琴

(陕西师范大学 食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710119)

**摘要:** 研究谷氨酸改性磁性壳聚糖微球对于牛血清白蛋白的吸附。采用反相悬浮法制备谷氨酸改性磁性壳聚糖微球(GA-CMN<sub>s</sub>),利用红外光谱仪检测壳聚糖连接谷氨酸效果、扫描电子显微镜(SEM)观察微球形貌、激光粒度仪检测微球粒径分布;考察不同 pH 值、NaCl 质量分数、BSA 质量浓度、吸附时间对谷氨酸改性磁性壳聚糖微球 BSA 吸附效果的影响,并对吸附行为进行吸附动力学和吸附热力学分析。结果表明:最佳吸附溶液 pH 值为 5,BSA 质量浓度、吸附时间与 BSA 吸附量呈正相关,而 NaCl 质量分数则相反;谷氨酸改性磁性壳聚糖微球对 BSA 吸附平衡过程符合动力学准二级方程模型和 Langmuir 吸附等温线模型,在 BSA 初始质量浓度为 1 mg/mL 时有最大平衡吸附值,为 83.5 mg/g;经过 5 次 3% NaCl 溶液洗脱-吸附操作循环后,洗脱率仍高于 90%。谷氨酸改性磁性壳聚糖微球对牛血清蛋白的吸附性能良好。

**关键词:** 磁性壳聚糖微球;谷氨酸;牛血清蛋白;吸附效果

中图分类号:TS 201.2;TS 251.9 文献标志码:A 文章编号:1673-1689(2017)12-1324-06

## Study of Adsorption Capacity of L-Glutamic Acid-Modified Magnetic Chitosan Microspheres on BSA

WAN wei, LI Linqiang\*, WANG Ruiqin

(College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

**Abstract:** This experiment explored the adsorption capacity of L-glutamic acid-modified magnetic chitosan microspheres (GA-CMN<sub>s</sub>) for BSA. GA-CMN<sub>s</sub> was prepared by reverse phase suspension method, the effect of chitosan glutamic acid connection was detected by infrared spectrometer. Microsphere morphology was detected by SEM, and the particle size distribution of microspheres was detected by laser particle size analyzer. The effects of different pH value, NaCl concentration, BSA concentrations, adsorption time were studied on BSA with GA-CMN<sub>s</sub>, and the adsorption behavior was analyzed by adsorption kinetics and adsorption thermodynamics. The results showed that the optimum adsorption pH was 5, it was a positive correlation between adsorption time and concentration of BSA to adsorbing capacity of BSA, while the ionic strength was the opposite. The maximum amount of equilibrium adsorption was 83.5 mg/g when initial concentration of BSA was 1

收稿日期: 2015-07-01

基金项目: 陕西省科学技术发展计划项目(2014K13-20)。

\* 通信作者: 李林强(1971—)男,陕西扶风人,理学博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事畜产品及功能食品方面的研究。

E-mail: liling@snnu.edu.cn

引用本文: 万威,李林强,王瑞琴.牛血清蛋白磁性壳聚糖微球谷氨酸改性吸附[J].食品与生物技术学报,2017,36(12):1324-1329.

mg/mL. This adsorption behavior was in accordance with the second dynamic model and Langmuir isothermal absorption models, 3% NaCl was used as eluent, and elution rate was still higher than 90% when adsorption-elution cycles 5 times. GA-CMN has good adsorption effect on BSA.

**Keywords:** magnetic chitosan microspheres, L-glutamic acid, bovine serum albumin, adsorption effect

我国的动物血资源极其丰富,每年约在  $2.3 \times 10^6$  t 以上,除少部分提取物得到利用外,大部分被废弃掉,既浪费资源又污染环境<sup>[1-2]</sup>。牛血清蛋白(BSA)是牛血浆中最丰富的蛋白质,具有许多重要的生理功能,常用于生物、医药和保健食品等领域,对其进行快速高效的分离纯化广受关注<sup>[3-4]</sup>。磁性微球分离、富集 BSA 是一种新兴技术,其易操作、效率高、成本低、易再生等优点<sup>[5-6]</sup>。壳聚糖是甲壳素脱乙酰基产物,作为碱性多糖其羟基、氨基含量丰富,易于通过化学修饰赋予多种功能<sup>[7]</sup>,由壳聚糖包覆磁性粒子制成的磁性壳聚糖微球兼有壳聚糖无毒与生物相容性好的特点<sup>[8]</sup>,但其对 BSA 吸附量较小,需对其进行改性以提高其吸附效果。通过在微球上连接羧基使其表面带负电荷,以提高其吸附能力,一直是研究的热点之一<sup>[9-14]</sup>。L-谷氨酸具有安全无害、廉价易得、不造成污染等优点,已广泛应用于食品行业,其所含氨基基团能够在弱碱条件下通过环氧氯丙烷与壳聚糖上的  $-NH_2$ 、 $-OH$  以共价键的方式结合,同时引入两分子的羧基基团。

作者采用反相悬浮法制备磁性壳聚糖微球,并通过环氧氯丙烷交联谷氨酸与磁性壳聚糖微球,探讨溶液 pH 值、BSA 质量浓度、吸附时间等因素对 BSA 吸附效果的影响,并考察微球的可重用性,以期对磁性分离技术用于牛血清蛋白的分离回收提供一种便捷的新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

壳聚糖(脱乙酰率  $\geq 90.0\%$ )、L-谷氨酸:购于上海蓝季科技发展有限公司;牛血清蛋白:购于美国 Amresco 公司;Span-80、液体石蜡:化学纯;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

Quanta 200 环境扫描电子显微镜:FEI 公司;Tensor27 红外光谱仪:德国 Bruker 公司;MS2000 激

光粒度分析仪:英国马尔文仪器公司;TU-1810 紫外可见分光光度计:北京普析通用公司;KQ-250DB 型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;雷磁 PHS-3C 酸度计:上海精密科学仪器有限公司;D2F-6020 型真空干燥箱:上海精宏实验设备有限公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 磁性壳聚糖微球的合成及谷氨酸改性** 根据文献[15]制备壳聚糖包覆  $Fe_3O_4$  磁性微球的方法并加以改进,采用反相悬浮法制备磁性壳聚糖微球<sup>[16-17]</sup>,并连接谷氨酸<sup>[18-19]</sup>。用 3% 的盐酸配置 60 mL 质量分数 3% 壳聚糖溶液,加入 100 mL  $FeCl_3$  溶液(0.15 mol/L)超声使其彻底混合均匀,在机械搅拌下加入 30 mL  $NaHSO_3$ (0.1 mol/L)溶液,当溶液由黄色变为红色再次变成黄色的瞬间用 12% 的氨水调节 pH 至 11,70 °C 剧烈搅拌 2 h 后磁铁吸附收集,用去离子水洗涤多次后加入 3% 的盐酸使其再次溶解,得到磁性壳聚糖盐酸溶液。

在 40 °C 恒温水浴条件下,加入 200 mL 液体石蜡和 8 mL Span-80 于 500 mL 烧瓶,机械搅拌混匀后,加入 40 mL 磁性壳聚糖盐酸溶液,剧烈搅拌 1 h,加入 5 mL 25% 戊二醛继续搅拌 1 h。将 0.4 g 谷氨酸、2 mL 环氧氯丙烷、适量 DMF 和 5 mL  $Na_2CO_3$ (0.5 mol/L) 溶液于 40 °C 搅拌活化 1 h 后滴加到烧瓶中。60 °C 剧烈搅拌 3 h,产物用去离子水、无水乙醇、石油醚、丙酮反复多次冲洗,用磁铁吸附分离于 60 °C 真空干燥 24 h。使用红外光谱仪(IR)检测壳聚糖包覆  $Fe_3O_4$  效果、壳聚糖与谷氨酸的连接效果;使用扫描电子显微镜(SEM)观察 GA-CMN 形貌;使用激光粒度仪检测 GA-CMN 的粒径分布情况。

**1.3.2 GA-CMN 对 BSA 的吸附容量** 准确称量 0.010 g GA-CMN 加入一定质量浓度的 BSA 溶液,25 °C 恒温水浴振荡(120 r/min)一段时间。通过磁铁吸附分离磁性微球,测定上清液在 UV278 nm<sup>[13]</sup> 吸光度值,并利用测定吸光度标准曲线计算 BSA 的初始

和最终质量浓度,利用下式计算吸附容量:

$$Q_e = (c_0 - c_1)V/m$$

式中,  $c_0$  为初始 BSA 质量浓度 (mg/mL);  $c_1$  为吸附后 BSA 质量浓度 (mg/mL);  $V$  为溶液的体积, mL;  $m$  为 GA-CMN 的质量 (g);  $Q_e$  为吸附容量 (mg/g)。

**1.3.3 不同 pH 值溶液对 BSA 吸附量的影响** 称取 10 mg 的 GA-CMN 的, 加入到 4 mL pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 质量浓度为 1 mg/mL 的 BSA 溶液中, 25 °C 恒温水浴振荡 100 min 后分离, 测定并计算吸附量, 采用 0.05 mol/L  $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$  缓冲液控制 pH 4.0~6.0; 采用 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液控制 pH 7.0~9.0。

**1.3.4 NaCl 质量分数对 BSA 吸附量的影响** 配置 BSA 质量浓度为 1 mg/mL, 称取 10 mg 的 GA-CMN 加入到 4 mL 含不同 NaCl 质量分数 (分别为 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0% 的 NaCl 溶液) 的 BSA 溶液中, 其余操作同上, 测量并计算吸附量。

**1.3.5 吸附时间对 BSA 吸附量的影响** 称取 50 mg GA-CMN 的, 加入 20 mL 质量浓度为 1 mg/mL BSA 溶液中, 120 min 内每 10 分钟取上清液测定并计算吸附量。

**1.3.6 初始 BSA 质量浓度对 BSA 吸附量的影响** 称取 10 mg GA-CMN 的, 加入 4 mL 质量浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0 mg/mL 的 BSA 溶液中, pH 值设置为 5.0, 吸附时间为 100 min, 测定并计算吸附量。

**1.3.7 GA-CMN 的再生** 取 10 mg GA-CMN 的将其饱和吸附 BSA 后, 分离后用选取的 NaCl 溶液在室温条件下于 120 r/min 振荡 30 min 后, 磁铁吸附分离, 取上清液在 UV278 nm 测定并用下式计算洗脱率:

$$\text{洗脱率}(\%) = cV_2 / (c_0 - c_e)V_1 \times 100\%$$

式中  $c$  为洗脱液中 BSA 的质量浓度 (mg/mL);  $V_2$  为洗脱液的体积 (mL);  $c_0$  为初始 BSA 质量浓度 (mg/mL);  $c_e$  为吸附后溶液中 BSA 的质量浓度 (mg/mL);  $V_1$  表示加入的 BSA 的体积 (mL)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 GA-CMN 的表征

图 1 解析结果表明, 壳聚糖 (a) 中 3 455  $\text{cm}^{-1}$  是 O-H 和 N-H 的伸缩振动峰, 2 923  $\text{cm}^{-1}$  和 2 853  $\text{cm}^{-1}$  的强峰属于 CH 伸缩聚合物骨架的振动, 而在

约 1 073  $\text{cm}^{-1}$  和 1 487  $\text{cm}^{-1}$  分别是 C-O 和壳聚糖环贡献的伸缩振动峰。壳聚糖改性微球 (b) 中 588  $\text{cm}^{-1}$  峰, 属于 Fe-O 伸缩振动。a 中的 1 644  $\text{cm}^{-1}$  属于伯胺 ( $-\text{NH}_2$ ) 的变形振动, 在 b 中消失, 出现 1 618  $\text{cm}^{-1}$  仲胺的振动吸收峰; 此外在 b 中可以观察到在 1 402  $\text{cm}^{-1}$  来自 R- $\text{CH}_2$ -COOH 的 CH 伸缩振动和 1 718  $\text{cm}^{-1}$  饱和 C=O 的伸展吸收峰, 并且位于 3 650~3 200  $\text{cm}^{-1}$  O-H 伸缩的吸收峰变宽, 进一步说明分子中存在羧基。由此红外光谱图可以说明谷氨酸成功交联到磁性壳聚糖微球上。

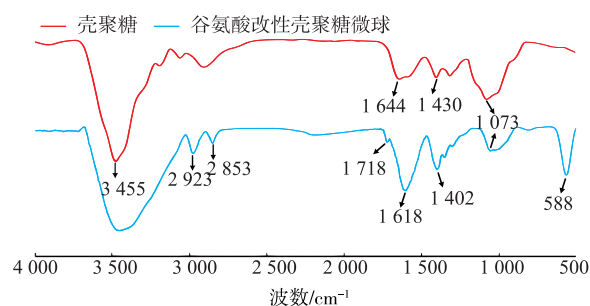
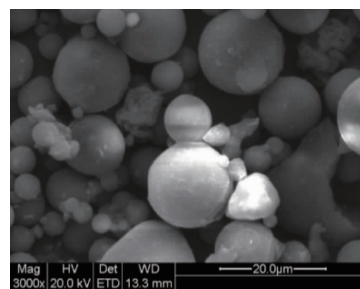


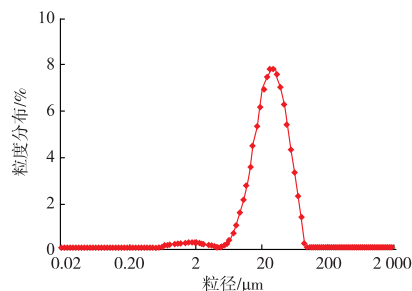
图 1 壳聚糖和谷氨酸改性壳聚糖微球的红外光谱

Fig. 1 FT-IR spectrum of chitosan and GA-CMN

由图 2(a) 可见, 在扫描电子显微镜下可见 GA-CMN 为类球形结晶, 表面较光滑且形状规则, 粒径为 5~20  $\mu\text{m}$ ; 由激光粒度仪测的数据图 2(b) 可见, 显示有 40% 的微球粒径小于 20  $\mu\text{m}$ , 已达到微米级。



(a)



(b)

图 2 GA-CMN 的形貌图 (a) 和 GA-CMN 的粒度分布图 (b)

Fig. 2 Microscopic morphology of GA-CMN and particle size distribution of GA-CMN

## 2.2 BSA 溶液标准曲线测定

准确称取 0.200 g BSA, 用 pH 5.0 的缓冲溶液溶解, 配制成 2 mg/mL 的 BSA 标准溶液, 再稀释成一系列标准浓度, 用紫外可见分光光度计扫描, 得到最大吸收波长为 278 nm, 与文献[11]报道一致。以质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制得到标准曲线。结果表明, 在 0~2.0 mg/mL 范围内其吸光度  $A$  与质量浓度  $c$  线性关系良好, 拟合方程为  $A=0.6138c+0.0121$ ,  $R^2=0.9992$ 。

## 2.3 溶液 pH 值对 BSA 吸附量的影响

由图 3 可见, 未改性微球对 BSA 吸附量随着 pH 值的改变变化不大, 而 GA-CMNs 对 BSA 最大吸附量出现在 pH 5.0, 接近 BSA 等电点<sup>[20]</sup>。因为在等电点时, BSA 呈电中性, BSA 分子间斥力最小<sup>[21]</sup>; pH 在 5.0 以上, GA-CMNs 上羧基以 COO<sup>-</sup>形式存在, pH 低于 5.0, GA-CMNs 和牛血清蛋白的胺基为 NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, 不利于氢键的形成<sup>[22]</sup>。因此, 在 pH 5.0 时, GA-CMNs 对 BSA 的吸附量达到最大值。

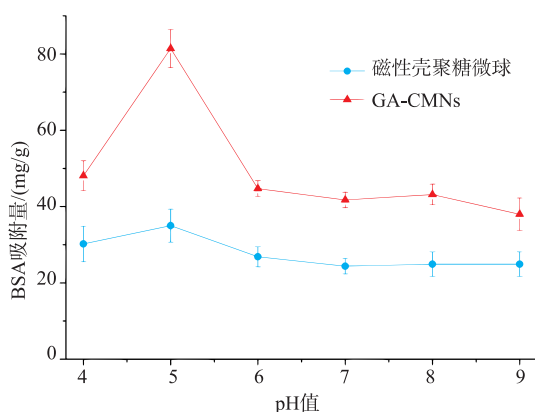


图 3 pH 对吸附效果的影响

Fig. 3 Influence of pH on adsorption of BSA

## 2.4 NaCl 质量分数对 BSA 吸附量的影响

由图 4 可见, GA-CMNs 对 BSA 的吸附量随着 NaCl 质量分数的增加逐渐减小。当 NaCl 质量分数增加到 0.5%, BSA 的吸附量下降约 20%; 当 NaCl 质量分数增加到 1%, 吸附量下降约 50%, 表明 BSA 吸附量受 NaCl 质量分数影响显著。可能由于 NaCl 质量分数的增加, 溶液离子氛围增强使得蛋白质分子间静电斥力增大, 导致迁移速度减慢; 并且吸附剂结合空间位阻与静电斥力的增加, 影响 BSA 分子构象, 破坏了 GA-CMNs 与 BSA 分子间的静电作用, 仅靠范德华力与 BSA 分子结合, 导致吸附效果

明显下降<sup>[22]</sup>。

用 Lagergren 一级吸附速率方程和二级吸附速率方程<sup>[23]</sup>进行拟合分析, 拟合所得方程分别为  $y=-0.0335x+2.0059$  和  $y=0.011x+0.0657$ , 决定系数 ( $R^2$ ) 分别为 0.9582 和 0.9941 说明准二级动力学模型更能反映 GA-CMNs 对 BSA 的吸附过程。

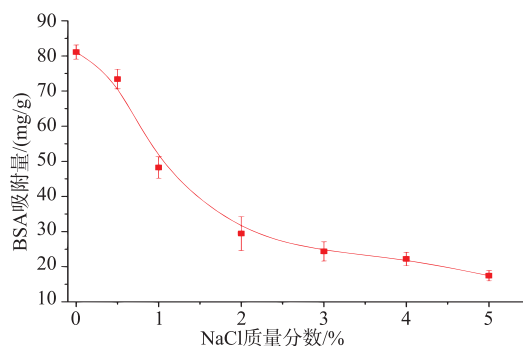


图 4 NaCl 质量分数对吸附效果的影响

Fig. 4 Influence of ionic strength on the adsorption of BSA

## 2.5 吸附时间对 BSA 吸附量的影响

由图 5 可见, 在前 30 分钟内随着时间的延长, GA-CMNs 对 BSA 的吸附量显著增大 ( $p < 0.05$ )。而 40 min 之后吸附量无显著变化 ( $p > 0.05$ ), 表明在 40 min 左右达到吸附平衡。结果表明, GA-CMNs 表面结合点在经过一段时间吸附占用后, 剩余吸附结合位点较难被利用, 表明其对 BSA 的吸附可能是单层覆盖。

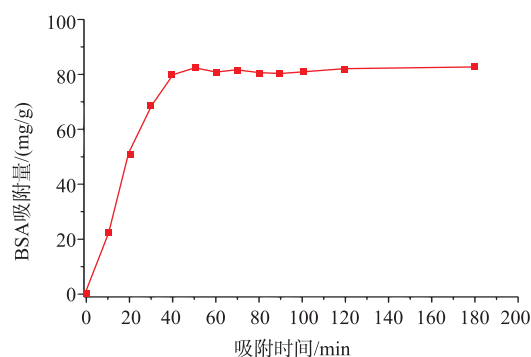


图 5 吸附时间对 BSA 吸附量的影响

Fig. 5 Influence of adsorption time on the adsorption of BSA

## 2.6 不同 BSA 质量浓度对吸附量的影响

由图 6 可见, GA-CMNs 对 BSA 的吸附量随着 BSA 溶液质量浓度的增大显著增加 ( $p < 0.05$ ), 最大平衡吸附量出现在 BSA 质量浓度为 1 mg/mL 附近,

再增大 BSA 的质量浓度, 吸附量变化不大, 最大吸附量为 83.5 mg/g。

用 Langmuir 方程和 Freundlich 方程<sup>[24]</sup>进行拟合分析, 所得决定系数 ( $R^2$ ) 分别为 0.997 7 和 0.975, 结果表明单层吸附为主的 Langmuir 模型拟合方程的决定系数比 Freundlich 模型拟合方程的决定系数高, 表明 GA-CMN 对 BSA 的吸附以单分子层为主。

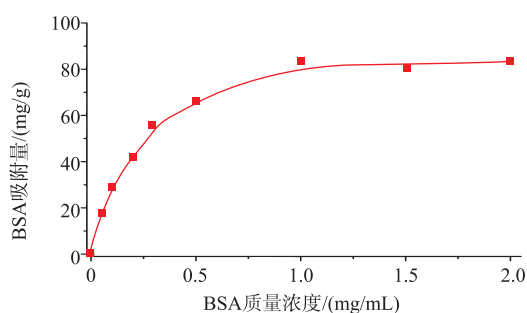


图 6 BSA 初始质量浓度对吸附量的影响

Fig. 6 Influence of initial concentration of BSA on its adsorption

### 2.7 GA-CMN 的再生

当溶液 NaCl 质量分数为 3% 时, GA-CMN 对 BSA 的吸附量下降了约 80%, 而继续加大 NaCl 质量分数, 吸附量下降不明显, 故选取质量分数为 3% 的 NaCl 溶液作为洗脱剂。经过 5 次吸附-洗脱循

环, 洗脱率仍大于 90%, 重复吸附量基本不变, 表明 GA-CMN 具有很好的重复使用性。

## 3 结语

以廉价易得的试剂为原料<sup>[9-10]</sup>在温和的条件<sup>[11-14]</sup>合成谷氨酸改性磁性壳聚糖微球。并以 BSA 为目标蛋白质, 研究了 GA-CMN 对 BSA 的吸附情况, 考察 pH 值、NaCl 质量分数、时间、BSA 初始质量浓度等条件对其吸附效果的影响, 并对 GA-CMN 的再生进行了研究。

红外图谱分析结果表明, 谷氨酸成功地交联在磁性壳聚糖微球的表面。扫描电子显微镜下观察到 GA-CMN 为表面较光滑、形状规则的类型球形结晶, 粒径为 5~20  $\mu\text{m}$ , 由激光粒度仪检测结果显示, 粒径小于 20  $\mu\text{m}$  占总体积的 40% 左右。在 25  $^{\circ}\text{C}$  时 GA-CMN 对 BSA 最佳吸附条件: pH 值为 5, BSA 质量浓度为 1 mg/mL, 饱和吸附时间为 40 min, 吸附量为 83.5 mg/g 左右。其对 BSA 吸附平衡过程符合准二级动力学方程和 Langmuir 吸附等温线模型。

用 3% 的 NaCl 溶液作为洗脱剂, 洗脱率为 97.2%, 经过 5 次吸附-洗脱循环, 洗脱率均大于 90%, 重复吸附量基本不变, 表明 GA-CMN 吸附洗脱性能良好。该方法制备过程简单、成本低廉、洗脱率高, 具有潜在的应用价值, 为进一步研究动物血液中血清蛋白回收等方面的应用提供参考。

## 参考文献:

- [1] GUO Ling, LIU Aiguo, HU Zhihe. Research advances in main proteins in bovine blood plasma[J]. *Food Science*, 2009, 30(21): 489-492. (in Chinese)
- [2] DENG Li, LIU Zhangwu, DU Jinping. Current research and development of animal blood extract activity[J]. *Food Science*, 2010, 31(21): 455-458. (in Chinese)
- [3] MARGARSON M P, SONI N. Serum albumin: touchstone or totem[J]. *Anaesthesia*, 1998, 53(8): 789-803(15).
- [4] BRAHMA A, MANDAL C, BHATTACHARYA D. Characterization of a dimeric unfolding intermediate of bovine serum albumin under mildly acidic condition[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2005, 1751(2): 159-169.
- [5] WEIT, KAEWTATHIPS, SHING K. Buffer effect on protein adsorption at liquid/solid interface [J]. *Journal of Physical Chemistry C*, 2009, 113(6): 2053-2062.
- [6] SAFARIK I, SAFARIKOVA M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides[J]. *Biomagnetic Research & Technology*, 2004, 2(1): 7.
- [7] KUMAR M N V R, MUZZARELLI R A A, MUZZARELLI C, et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives[J]. *Chemical Reviews*, 2004, 104(11): 6017-6084.
- [8] SONG Yanyan, KONG Weibao, SONG Hao, et al. Reseach progress in magnetic chitosan microspheres[J]. *Chemical Industry*

- and **Engineering Progress**, 2012, 31(2): 345-354. (in Chinese)
- [9] LI G Y, JIANG H Y R. Preparation and characterization of carboxyl functionalization of chitosan derivative magnetic nanoparticles[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2008, 40(3): 408-414.
- [10] MALEKI A, PAJOOTAN E, HAYATI B. Ethyl acrylate grafted chitosan for heavy metal removal from wastewater: equilibrium, kinetic and thermodynamic studies[J]. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 2015, 51: 127-134.
- [11] DENG Jun, LI Mingchun, XIN Meihua, et al. Adsorption of bovine serum albumin on chitosan microspheres modified by  $\alpha$ -ketoglutaric acid[J]. **Chemical Industry and Engineering Progress**, 2008, 27(12): 1991-1995. (in Chinese)
- [12] LEE S Y, AHN C Y, LEE J, et al. Amino acid side chain-like surface modification on magnetic nanoparticles for highly efficient separation of mixed proteins[J]. **Talanta**, 2012, 93(2): 160-165.
- [13] ZHOU Y T, NNE H L, BRANFORD W C, et al. Removal of  $\text{Cu}^{2+}$  from aqueous solution by chitosan-coated magnetic nanoparticles modified with alpha-ketoglutaric acid[J]. **Journal of Colloid & Interface Science**, 2009, 330(1): 29-37.
- [14] WU Zhichao, CHEN Guo, SU Pengfei, et al. Adsorption properties of bovine serum albumin on carboxyl-functionalized superparamagnetic nanoparticle[J]. **Journal of Huaqiao University: Natural Science**, 2015, 51: 127-134. (in Chinese)
- [15] CAO C, XIAO L, CHEN C, et al. In situ preparation of magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ /chitosan nanoparticles via a novel reduction-precipitation method and their application in adsorption of reactive azo dye[J]. **Powder Technology**, 2014, 260(7): 90-97.
- [16] LI Z. Affinity adsorption of lysozyme with Reactive Red 120 modified magnetic chitosan microspheres[J]. **Food Chemistry**, 2014, 145(6): 749-755.
- [17] XIE Yu, WEI Ya, LI Mingjun, et al. Preparation and characterization of magnetic chitosan compound microspheres[J]. **Materials for Mechanical Engineering**, 2009, 33(12): 59-61. (in Chinese)
- [18] LIU Manying, PEI Zhene, LI Junliang, et al. Adsorption of chitosan beads modified with phenyl, alanine, tryptophan for cholesterol[J]. **Ion Exchange and Adsorption**, 1999, 15(1): 90-94. (in Chinese)
- [19] 洪爱真. 胺基化壳聚糖微球吸附阴离子偶氮染料的研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2003.
- [20] HE Rui, WANG Yang, CAO Guangqun, et al. Adsorption of bovine serum albumin on polystyrene functional microsphere[J]. **Petrochemical Technology**, 2007, 36(7): 731-734. (in Chinese)
- [21] HAN J, SILCOCK P, JAMES McQuillan A, et al. Bovine serum albumin adsorption on N-methyl-D-glucamine modified colloidal silica[J]. **Colloids & Surfaces A Physicochemical & Engineering Aspects**, 2009, 349(349): 207-213.
- [22] SU Lizheng, LI Mingchun, XIN Meihua, et al. Study on adsorption of bovine serum albumin on crosslinked chitosan microsphere[J]. **Technology & Development of Chemical Industry**, 2008, 37(7): 4-8. (in Chinese)
- [23] YANG W, DING P, ZHOU L, et al. Preparation of diamine modified mesoporous silica on multi-walled carbon nanotubes for the adsorption of heavy metals in aqueous solution[J]. **Applied Surface Science**, 2013, 282(10): 38-45.
- [24] ZHOU Y T, NIE H L, BRANFORD W C, et al. Removal of  $\text{Cu}^{2+}$  from aqueous solution by chitosan-coated magnetic nanoparticles modified with alpha-ketoglutaric acid[J]. **Journal of Colloid & Interface Science**, 2009, 330(1): 29-37.