

牛血清白蛋白键合的液相手性整体柱制备及其蛋白柱载量的研究

武 苏,王 伟,季一兵*

(中国药科大学分析化学教研室,南京 210009)

摘 要 蛋白质柱载量的测定对优化蛋白质类手性整体柱的制备条件具有重要意义。采用热引发原位聚合方法制备了聚甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)-乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)液相整体柱,而后采用环氧法直接键合手性选择剂牛血清白蛋白(BSA),制得高效液相手性整体柱,并且建立考马斯亮蓝(CBB)法测定手性整体柱上的蛋白柱载量。结果显示,BSA最大的柱载量为 11.90 mg/g,此时致孔剂组成为环己醇-十二烷醇(65:35)。将制备的高效液相手性整体柱用于色氨酸和华法林的拆分,色氨酸的两个对映异构体达到基线分离。高效液相手性整体柱的蛋白柱载量与手性拆分的效果呈现正相关。

关键词 高效液相手性整体柱;牛血清白蛋白;考马斯亮蓝法;蛋白柱载量;手性拆分

中图分类号 O657 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)02-0176-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160209

引用本文 武苏,王伟,季一兵.牛血清白蛋白键合的液相手性整体柱制备及其蛋白柱载量的研究[J].中国药科大学学报,2016,47(2):176-181.

Cite this article as: WU Su, WANG Wei, JI Yibing. Preparation of bovine serum albumin immobilized chiral monolithic column and its protein bonding quantity[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(2): 176-181.

Preparation of bovine serum albumin immobilized chiral monolithic column and its protein bonding quantity

WU Su, WANG Wei, JI Yibing*

Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Determination of exact total protein bonding quantity is often a key step in the preparation of protein-immobilized chiral monolith. In this study, we developed and evaluated a bovine serum albumin (BSA) modified monolith based on glycidyl methacrylate (GMA) and ethylene dimethacrylate (EDMA) for chiral separation. The epoxy groups of the polymer were used directly for the covalent bonding of BSA. A Coomassie brilliant blue (CBB) protein assay (Bradford method) was established to determine the protein bonding quantity, and the influence of some key aspects such as ionic strength, pH value and reaction time were studied. The method was validated with respect to linearity, precision, accuracy and robustness. The maximum amount of immobilized BSA was 11.90 mg/g, obtained using 65 : 35 cyclohexanol/dodecanol as the porogen. The monolith was successfully applied in the chiral separation of *R/S*-warfarin and *D/L*-tryptophan in only 1-20 min. Furthermore, the chromatographic conditions like pH and organic additive of the mobile phase were optimized. The chiral separation performance of this BSA-immobilized monolith is positively correlated to the protein bonding quantity.

Key words chiral monolithic column; bovine serum albumin; Coomassie brilliant blue protein assay; protein bonding quantity; chiral separation

牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)类手性选择剂适合分离氨基酸及其衍生物、香豆素类等光学异构体^[1-5]。蛋白质作为流动相添加剂进行手性拆分存在使用成本高、背景吸收强大等缺点。因此,将其作为固定相的应用得到迅速发展。

将蛋白质固定在聚甲基丙烯酸缩水甘油酯(glycidyl methacrylate,GMA)-乙二醇二甲基丙烯酸酯(ethyleneglycol dimethacrylate,EDMA)整体柱上用于手性拆分,延长了蛋白质作为手性选择剂的使用寿命,并去除了背景干扰^[6-8]。

作为手性选择剂,蛋白质的量与手性拆分的效果密切相关。Hong 等^[9-10]制备了蛋白键合的硅胶毛细管整体柱,并考察了不同蛋白质浓度对手性拆分的影响。Faye 等^[11]将抗体固载在整体柱上,采用氨基酸比色定量法(amino density estimation by colorimetric assay,ADECA)法和 BCA(bicinchoninic acid)法测量键合的抗体质量。还有研究人员采用 BCA 法和前沿分析法测量整体柱蛋白柱载量,步骤复杂且会破坏柱床结构^[3,12-13]。

本研究制备了聚 GMA-EDMA 液相整体柱,进一步采用环氧法键合 BSA 制备了液相手性整体柱。此外,本研究建立了采用考马斯亮蓝测定整体柱的蛋白柱载量的方法。该方法具有灵敏高效、可操作性强的特点^[14-16]。本研究测定了不同致孔剂比例下制备的手性整体柱的蛋白柱载量,将制备的手性柱用于色氨酸等化合物的手性拆分,比较了不同蛋白柱载量手性柱的拆分效果。

1 材 料

1.1 试 剂

聚甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)、乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)、偶氮二异丁腈(azobisisobutyronitrile,AIBN)、正己醇、十二烷醇、色氨酸、华法林[阿拉丁试剂(上海)有限公司];牛血清白蛋白(BSA,美国 Sigma 公司);考马斯亮蓝 G250(国药集团化学试剂有限公司);磷酸盐等其他试剂均为市售分析纯;实验用水为纯净水。上述试剂在使用前用 0.45 μm 有机微孔滤膜过滤;GMA 和 EDMA 使用前用 0.1 mol/L NaOH 溶液处理以除去阻聚剂。

1.2 仪 器

1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);

1800 紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司);S-3400N II 扫描电子显微镜(日本 Hitachi 公司);PB-10 pH 计、BT25S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

2 方 法

2.1 聚 GMA-EDMA 高效液相整体柱的制备

高效液相整体柱反应液由活性单体 GMA,交联剂 EDMA,致孔剂体系环己醇、十二烷醇和引发剂 AIBN 组成。精密称取 AIBN 0.008 g,溶于 GMA 0.48 mL、EDMA 0.16 mL、环己醇 0.78 mL、十二烷醇 0.42 mL 均匀混合液中。振荡 5 min 使其完全溶解。通氮气除氧 15 min,过滤,灌注于钢管柱(50 mm \times 4.6 mm)内。两端封口。水浴 80 $^{\circ}\text{C}$ 反应 24 h。依次用乙腈、水冲洗至整体柱内的致孔剂、未反应的单体和其他杂质去除完全,保存备用。

2.2 BSA 键合的高效液相手性整体柱的制备

手性柱用 pH 8.0 的 1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)平衡 30 min。称取 BSA 适量,溶于 1 mol/L PBS(pH 8.0)中,配制成约 6 mg/mL BSA 溶液。精密量取该溶液 25 mL,室温下以 0.33 mL/min 的流速循环过柱 2 d。用 100 mmol/L PBS(pH 8.0)以 0.5 mL/min 的流速冲洗不稳定吸附蛋白 2 h。用色谱条件下的流动相 67 mmol/L PBS(pH 7.4)平衡 4 h。

2.3 高效液相手性整体柱蛋白质柱载量的测定

溶液 a:蛋白键合反应前约 6 mg/mL BSA 溶液用水稀释备用(稀释后基底溶液 PBS 的浓度为 0.01 mol/L);溶液 b:收集蛋白键合反应后整体柱流出的 BSA 溶液用水稀释备用(稀释后基底溶液 PBS 的浓度约为 0.01 mol/L);溶液 c:收集冲洗不稳定吸附蛋白的流出液用水稀释备用(稀释后基底溶液 PBS 的浓度约为 0.033 mol/L)。

采用考马斯亮蓝法分别测定 3 种溶液中的蛋白质含量。取上述溶液 1 mL 加入考马斯亮蓝 G250 溶液 5 mL,涡旋 30 s,静置 8 min 后在 595 nm 处测吸收度。

手性整体柱蛋白柱载量 = (A - B - C)/整体柱柱床质量。其中,A、B、C 分别为溶液 a,b,c 中蛋白质含量。

2.4 高效液相手性整体柱在手性拆分中的应用

高效液相手性整体柱在分离样品前,用色谱条

件下的流动相平衡至基线平稳。流动相为 67 mmol/L PBS。色氨酸和华法林的检测波长分别为 280 和 308 nm。

3 结果与讨论

3.1 聚 GMA-EDMA 高效液相整体柱的制备条件优化及性能考察

3.1.1 聚合反应中交联剂比例及温度的影响 交联剂的用量直接影响了整体柱的孔度、孔容及平均孔径,最直接的反映即是对柱压的影响。分别制备了交联剂 EDMA 用量范围在 10% ~ 90% 的整体柱,在以水为流动相,流速为 1 mL/min 条件下测其柱压。结果表明,柱压随着 EDMA 用量的增大而增大。当 EDMA 用量低于 30% 时,柱压不再有明显变化,稳定在 30 bar ($1 \text{ bar} = 1 \times 10^5 \text{ Pa}$) 左右。但当 EDMA 用量低于 20% 时,柱床开始出现不同程度的收缩,柱床的机械强度下降。当 EDMA 用量高于 50% 时,柱压有明显的升高。当 EDMA 用量达到 90% 时,柱压升高至 84 bar。这可能是因为增加了交联剂的比例,聚合物交联程度加剧,整体柱骨架的孔减小,相应整体柱的柱压增大^[17]。若交联度过低,不能保证柱床的机械刚性,而过高的交联度则降低了单体的含量,从而使骨架上的活性基团降低,不能保证配基密度。因此,综合考虑渗透性、机械强度及活性基团的含量,初步选择 EDMA 比例为 25% 作为实验条件。

聚合反应的温度主要影响引发剂 AIBN 的活性,进而对柱床结构有一定影响。AIBN 的使用温度范围为 45 ~ 80 °C。分别考察了 60 °C、70 °C、80 °C 的聚合条件。结果显示,当温度为 70 °C 时,整体柱的柱床质地较软,机械强度较差。80 °C 下制备的整体柱柱床机械强度良好,因此选择 80 °C 作为反应条件。

3.1.2 整体柱内的微观结构 用扫描电子显微镜观察柱内部形貌,其微观结构信息如图 1 所示。可以看出整体柱结构均匀,既有簇与簇之间的贯通孔(大孔),又有颗粒与颗粒及颗粒与簇之间的微孔、中孔,既保证了柱床良好的通透性,又可以使溶质与固定相充分地相互作用。

3.1.3 整体柱的耐压性与渗透性考察 分别以水与甲醇为流动相来考察整体柱的耐压性与渗透性。柱压与流动相流速的关系如图 2 所示。结果表明,

柱压与流速的线性关系良好($r > 0.999$),当流动相流速达到 4 mL/min 时,柱压仅为 100 bar 左右。实验操作中的压力在整体柱的耐受范围内,整体柱耐压性与渗透性良好。

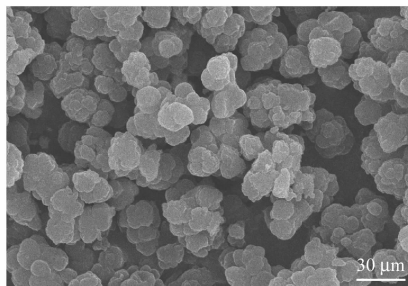
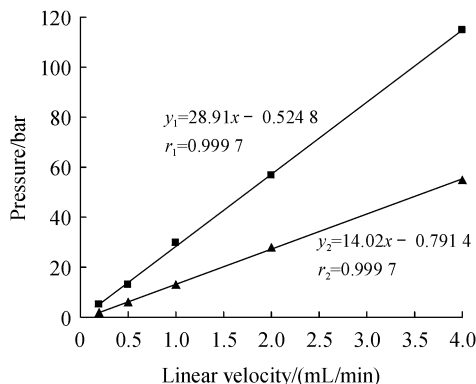


Figure 1 Scanning electron micrograph of the monolithic column



—■—Water; —▲—Methanol

Figure 2 Linear dependency of the pressure of monolithic column on the linear velocity of eluent

3.2 高效液相手性整体柱蛋白柱载量测定方法的建立

考马斯亮蓝测定蛋白含量的方法属于染料结合法。考马斯亮蓝 G250 在游离状态下呈现红棕色,与蛋白结合后产生蓝色的络合物,该络合物在最大吸收波长下吸收度与蛋白质含量成正比。该法操作简单、灵敏度高、干扰物质少,因此,选择该法测量蛋白柱载量。

3.2.1 影响因素考察

基底溶液的 pH 分别考察了基底溶液为 pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 的磷酸盐缓冲液,BSA 含量为 20 ~ 100 μg 时,吸收度的变化。结果表明,当基底溶液的 pH 在一个较小范围内变动(如 pH 6.0 ~ 9.0)时,相同 BSA 浓度的溶液的测定结果基本相同,误差范围 ± 5%,满足测量蛋白柱载量的实验要求。可能由于考马斯亮蓝 G250 溶液本身为强酸性,基底溶液 pH 的微小变动,对整个反

应体系(考马斯亮蓝 G250 与 BSA 溶液的混合溶液)的 pH 影响较小,因此对吸收度几乎没有影响。

基底溶液的离子强度 分别考察了基底溶液为水、0.01 mol/L PBS、0.05 mol/L PBS、0.1 mol/L PBS,BSA 含量为 20 ~ 100 μg 时,吸收度的变化。结果表明,当基底溶液为水、0.01 mol/L PBS、0.05 mol/L PBS 时,相同 BSA 浓度的溶液的吸收度基本相同,误差范围 ± 5%。而当基底溶液为 0.1 mol/L PBS 时,吸收度明显增高。测量蛋白柱载量时,基底溶液浓度均在 0.01 ~ 0.05 mol/L 范围内,满足实验要求。

反应时间 考马斯亮蓝 G250 与 BSA 形成的络合物的稳定性是影响准确性的一个重要因素。分别在反应 2,4,6,8,10,20,40,60,90,120 min 后测定考马斯亮蓝 G250-BSA 络合物的吸收度。结果显示,考马斯亮蓝 G250 与 BSA 反应迅速,2 ~ 4 min 内即可完成,这个阶段内 595 nm 处的吸收度上升。6 min 以后,吸收度基本保持稳定,反应已经完全进行。60 min 以后,吸收度下降,120 min 后,吸收度几乎已经下降一半。说明 60 min 后考马斯亮蓝 G250-BSA 络合物不稳定。综合考虑实验时间及结果的准确性,选择 8 min 作为反应时间。

3.2.2 方法学考察

对建立的考马斯亮蓝测蛋白柱载量的方法进行方法学验证,基底溶液分别为 0.010 mol/L PBS 及 0.033 mol/L PBS。

线性范围 BSA 含量在 20 ~ 140 μg 范围内线性关系良好。基底溶液为 0.010 mol/L PBS、0.033 mol/L PBS;线性方程分别为 $Y=0.005\ 1X+0.000\ 3$, $Y=0.004\ 8X+0.000\ 9$;相关系数分别为 0.999 6 和 0.999 3。

精密性 基底溶液分别为 0.010 mol/L PBS 及 0.033 mol/L PBS,BSA 溶液连续测量 6 次,吸收度的 RSD 分别为 0.27% 和 0.32%。

准确度 基底溶液分别为 0.010 mol/L PBS 及 0.033 mol/L PBS,流经整体柱后,加入不同浓度水平的 BSA,计算回收率。回收率分别为 $(100.1 \pm 1.7)\%$ 和 $(99.50 \pm 1.9)\%$ 。

溶液稳定性 基底溶液分别为 0.010 mol/L PBS 及 0.033 mol/L PBS,BSA 溶液放置 0,2,4,6,

8,12 d 后测定其 BSA 含量,RSD 分别为 0.79% 和 1.2%。

3.3 高效液相手性整体柱蛋白柱载量的测定

在聚 GMA-EDMA 整体柱制备过程中,致孔剂的比例不仅影响孔径的大小,而且与整体柱键合蛋白的量也有紧密关系。这是由于蛋白质是具有一定空间结构的生物大分子,其三维空间结构与手性拆分能力相关。蛋白质与整体柱键合,不仅需要柱床表面的活性基团,也需要整体柱提供合适的孔径大小。图 3 显示了采用上述建立的考马斯亮蓝法测量的不同致孔剂比例条件下制备的高效液相手性柱的蛋白柱载量。结果表明,当环己醇-十二烷醇体积比为 65:35 时,BSA 柱载量达到最大值 11.90 mg/g。

以色氨酸和华法林为目标化合物,采用在最优化条件下制备的手性整体柱拆分,分别研究了流动相 pH、有机添加剂对手性拆分的影响。

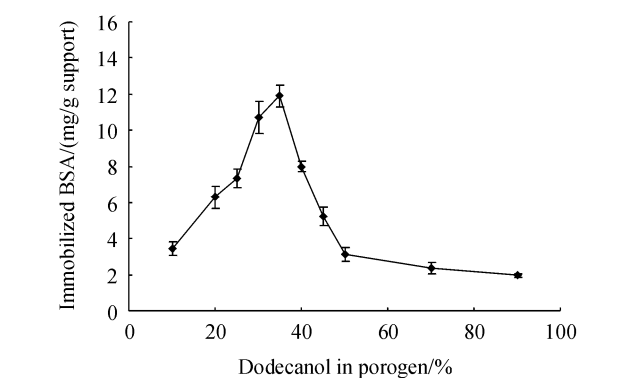


Figure 3 Effect of varying the porogen composition on the amount of bovine serum albumin attached to monolithic column($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.4 高效液相手性整体柱的应用

3.4.1 流动相 pH 对手性拆分的影响 由于 BSA 的等电点为 4.8,主要研究高效液相手性整体柱在流动相 pH 范围为 6 ~ 9 时对色氨酸对映体的分离情况。当流动相的 pH 小于 7.4 时,色氨酸没有拆分迹象。当流动相的 pH 等于 7.4 时,分离度为 0.62。如图 4 所示,当流动相的 pH 从 7.4 升高到 8.6 时,色氨酸的分离度增加。当流动相的 pH 达到 8.2 时,色氨酸即达到基线分离。随着流动相 pH 的改变,色氨酸的分离度变化明显。pH 主要影响溶质与固定相之间的静电作用,说明色氨酸与 BSA 之间的静电作用是影响其分离的关键因素。

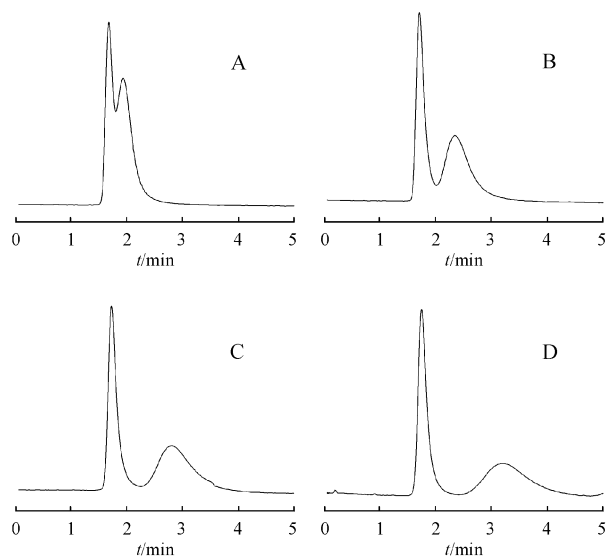


Figure 4 Enantioseparation of tryptophan in 67 mmol/L PBS with different pH

A: pH 7.4; B: pH 7.8; C: pH 8.2; D: pH 8.6

当流动相 67 mmol/L PBS 的 pH 从 6.6 变化到 8.6 时, 华法林的分离度并没有明显的改善。说明流动相的 pH 不是影响华法林手性拆分的主要因素。

3.4.2 有机添加剂对手性拆分的影响 流动相中的有机添加剂会与溶质竞争蛋白固定相位点, 从而影响溶质在色谱柱上的保留行为, 达到抑制峰拖尾、有效改善峰型、增加分离度的作用。常用的有机添加剂有甲醇、乙腈、异丙醇等。

随着流动相 67 mmol/L PBS (pH 8.6) 中有机添加剂异丙醇比例 (0% ~ 1%) 的变化, 色氨酸的分离度略为下降。在流动相中添加甲醇、乙腈后, 色氨酸的分离度并没有明显变化。因此, 有机添加剂对色氨酸的手性拆分影响较小。

图 5 显示了不同有机添加剂对华法林手性拆分的影响。结果显示, 在不添加有机添加剂的流动相中, 华法林的分离度为 0.64。流动相中添加 0.5% 异丙醇后, 分离度增加到 0.79。流动相中添加 0.5% 甲醇和 0.5% 乙腈后, 分离度分别为 0.59 和 0.61。流动相中添加 3 种有机添加剂均使华法林保留时间缩短, 其中添加异丙醇的保留时间最短。

3.5 高效液相手性整体柱蛋白柱载量与手性拆分的相关性

当环己醇与十二烷醇的体积比为 65:35 时, 制备的整体柱上 BSA 的柱载量达到最大值 11.90

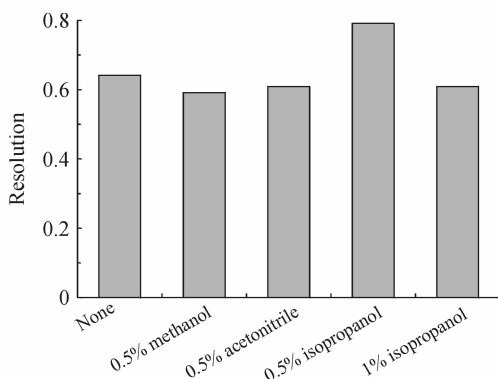


Figure 5 Effect of organic additive in mobile phase on the resolution of warfarin

mg/g。此柱用于拆分色氨酸和华法林, 分离度最高达到 1.77 和 0.79。当环己醇与十二烷醇的体积比为 70:30 时, BSA 的柱载量为 10.73 mg/g。该柱在同样条件下拆分色氨酸和华法林, 分离度分别为 0.64 和 0.37, 明显低于 BSA 柱载量最高的手性柱。其他致孔剂比例下制备的整体柱, BSA 柱载量均低于 10.0 mg/g, 对色氨酸和华法林没有明显的拆分效果。因此, 手性整体柱的拆分效果与蛋白柱载量呈正相关。

采用本研究中制备的 BSA 柱载量最大的手性整体柱拆分华法林, 分离度为 0.79, 未达到基线分离, 原因可能是该手性整体柱上键合的 BSA 的量仍不够。这也为后续的研究提供了思路 and 方向, 即通过进一步优化手性整体柱的制备条件, 提高手性整体柱的蛋白柱载量来改善拆分效果, 进而实现多种手性药物的分离。

4 结论

本研究建立了一种新的蛋白类手性整体柱表征的方法, 即利用考马斯亮蓝测定手性整体柱蛋白柱载量。该方法准确、可操作性强, 为优化手性整体柱的制备过程提供了新方向。实验中制备了蛋白质键合的高效液相手性整体柱, 探讨了多种因素对色谱柱性能的影响。制备的手性整体柱内部结构均匀, 渗透性、机械强度良好, 在等度洗脱条件下进行手性化合物的分离研究, 两种手性化合物 (色氨酸和华法林) 在 20 min 内均可实现良好分离。实验结果证明手性柱的蛋白柱载量与手性拆分的效果呈正相关性。本研究为蛋白类高效液相手性整体柱的应用研究提供了新的思路和方法。

参 考 文 献

- [1] He J, Ji YB. The development of protein as chiral selectors[J]. *Pharm Clin Res* (药学与临床研究), 2013, **21**(2): 166–171.
- [2] Zheng Y, Wang X, Ji YB. Monoliths with proteins as chiral selectors of enantiomer separation[J]. *Talanta*, 2012, **91**: 7–17.
- [3] Matsunaga H, Haginaka J. Separation of enantiomers on chiral stationary phase based on chicken α_1 -acid glycoprotein: effect of silica particle diameters on column performance[J]. *J Chromatogr A*, 2014, **1363**: 96–100.
- [4] Hage DS, Anguizola JA, Bi C, et al. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, **69**: 93–105.
- [5] Yao CH, Qi L, Qiao J, et al. High-performance affinity monolith chromatography for chiral separation and determination of enzyme kinetic constants[J]. *Talanta*, 2010, **82**(4): 1332–1337.
- [6] Jiang T, Mallik R, Hage DS. Affinity monoliths for ultrafast immunoextraction[J]. *Anal Chem*, 2005, **77**(8): 2362–2372.
- [7] Mallik R, Hage DS. Affinity monolith chromatography[J]. *J Sep Sci*, 2006, **29**(12): 1686–1704.
- [8] Pan Z, Zou H, Mo W, et al. Protein A immobilized monolithic capillary column for affinity chromatography[J]. *Anal Chem Acta*, 2002, **466**(1): 141–150.
- [9] Hong TT, Chi CJ, Ji YB. Pepsin-modified chiral monolithic column for affinity capillary electrochromatography[J]. *J Sep Sci*, 2014, **37**(22): 3377–3383.
- [10] Hong TT, Zheng Y, Hu WW, et al. Preparation and evaluation of bovine serum albumin immobilized chiral monolithic column for affinity capillary electrochromatography[J]. *Anal Biochem*, 2014, **464**: 43–50.
- [11] Faye C, Chamieh J, Moreau T, et al. In situ characterization of antibody grafting on porous monolithic supports[J]. *Anal Biochem*, 2012, **420**(2): 147–154.
- [12] Pfannmiller E, Hartmann M, Hage DS. Optimization of human serum albumin monoliths for chiral separations and high-performance affinity chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2012, **1269**: 198–207.
- [13] Mallik R, Hage DS. Development of an affinity silica monolith containing human serum albumin for chiral separations[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, **46**(5): 820–830.
- [14] Redmile-Gordon M, Armenise E, White R, et al. A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts[J]. *Soil Biol Biochem*, 2013, **67**(100): 166–173.
- [15] Carlsson N, Borde A, Wolfel S, et al. Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers[J]. *Anal Biochem*, 2011, **411**(1): 116–121.
- [16] Wenrich BR, Trumbo TA. Interaction of nucleic acids with Coomassie blue G-250 in the Bradford assay[J]. *Anal Biochem*, 2012, **428**(2): 93–95.
- [17] Svec F. Quest for organic polymer-based monolithic columns affording enhanced efficiency in high performance liquid chromatography separations of small molecules in isocratic mode[J]. *J Chromatogr A*, 2012, **1228**: 250–262.



中國藥科學學報

中国精品科技期刊 中国高校精品科技期刊
中国中文核心期刊 中国科学引文数据库核心期刊

传播医药科技创新研究成果的优秀媒体

药学前沿

提供药学领域的前沿信息 反映最新的药学研究进展

创新成果

展示医药科技最新成果 构建学术交流的平台

研究论文

科学研究原创论文 国家重大药学研究基金产出论文

邮发代号: 28-115, 欢迎订阅, 欢迎投稿!