

# 填料组成及微观结构对 胰高血糖素样肽-1 的分离效果研究

徐 灿<sup>1</sup>, 赵燕燕<sup>2</sup>, 邱心宇<sup>1</sup>, 高 原<sup>1\*</sup>

(1. 烟台大学化学化工学院, 山东 烟台 264005; 2. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005)

**摘要:**胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 在细胞构建过程中产生信号肽和 N-2、N-22 截短型等多种杂质, 分离纯化难度大。以聚甲基丙烯酸酯 (PMMA)、聚苯乙烯-二乙烯基苯 (PS-DVB) 和交联琼脂糖 (AG) 3 种不同基质 (matrix) 的阴离子交换填料为研究对象, 探讨填料基质、表面微观结构与层析分离效果之间的关系。研究表明, PMMA 强阴离子交换填料对分离 GLP-1 具有高选择性; 粒径均匀度、机械强度以及表面孔径对样品分离效果具有很大影响。

**关键词:**胰高血糖素样肽-1; 阴离子交换填料; 分离纯化; 构效关系

中图分类号: TQ464

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2021)05-0120-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2021.05.025

## Effect of composition and microstructure of packings on separation of glucagon-like peptide-1

XU Can<sup>1</sup>, ZHAO Yan-yan<sup>2</sup>, QIU Xin-yu<sup>1</sup>, GAO Yuan<sup>1\*</sup>

(1. College of Chemistry & Chemical Engineering, Yantai University, Yantai 264005, China;

2. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China)

**Abstract:** During cell construction process, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) generates a variety of impurities such as signal peptides and N-2, N-22 truncated types, which is difficult to separate and purify. Three anion exchange packings, including polymethyl methacrylate (PMMA), polystyrene-divinylbenzene (PS-DVB) and cross-linked agarose (AG), are used as research objects. Relationships among packings matrix, surface microstructure and separation effect are discussed. Results show that PMMA packings exhibit a high selectivity for the separation of GLP-1. Particle size uniformity, mechanical strength and surface pore diameter have great influences on the separation effect.

**Key words:** glucagon-like peptide-1; anion exchange packings; separation and purification; structure-activity relationship

胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 是肠道内 L 细胞分泌的一种肽类激素, 由胰高血糖素原转化而来, 是一种重要的肠促胰岛素, 是目前能诱导胰岛素分泌的最强物质之一<sup>[1-2]</sup>。GLP-1 在细胞构建过程中会产生多种杂质, 需采用多种步骤分离纯化<sup>[3]</sup>。目前用于纯化分离的色谱填料主要有无机填料和有机聚合物填料<sup>[4-8]</sup>。无机填料粒径可控, 但 pH 使用范围窄 (2.0~8.0), 应用受限<sup>[9]</sup>。有机聚合物填料易被衍生优化, 选择性好、负载能力强、色谱容量高。有机聚合物填料表面官能团较多, 功能基可直接键合到基质上, 特别是大孔填料载量高、应用广。此外, 相对于无机物材料而言属于软材料, 受压后易恢复<sup>[10-12]</sup>。

GLP-1 发酵液经过 Protein A 亲和层析柱分离纯化后, 需进一步采用阴离子层析柱去除杂质离子。从理论上讲, 采用阴离子交换填料去除杂质离子, 其性能优劣主要与填料所含强碱性基团 (如季胺基)、

填料类型 (凝胶型、大孔型) 以及颗粒尺寸等有关<sup>[13-14]</sup>。对于填料基质 (matrix) 是否产生影响, 一般考虑较少。但在实验过程中发现, 采用不同材质制备的填料基质对分离纯化效果会产生一定的影响。因此, 笔者分别选取聚甲基丙烯酸酯类 (PMMA)、聚苯乙烯-二乙烯基苯 (PS-DVB) 和交联琼脂糖 (AG) 为基质的阴离子交换填料各 2 种, 探讨其分离纯化效果与填料基质、微观结构之间的关系, 为工业化生产提供一些可借鉴的理论分析和实验数据。

## 1 实验部分

### 1.1 实验材料

实验所用强阴离子交换 (季铵盐) 填料包括聚甲基丙烯酸酯类: PMMA-1 (国产)、PMMA-2 (国产); 聚苯乙烯-二乙烯基苯类: PS-1 (美国)、PS-2 (美国); 交联琼脂糖类: AG-1 (美国)、AG-2 (国产)。

收稿日期: 2020-06-21; 修回日期: 2021-03-06

基金项目: 国家自然科学基金 (51573155); 烟台大学研究生科技创新基金 (YDYB2012)

作者简介: 徐灿 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为材料改性及涂层, xucanyt@163.com; 高原 (1967-), 男, 博士, 教授, 主要从事复合材料的研究, 通讯联系人, gaoyyt@163.com。

无水乙醇(EtOH),AR,国药集团化学试剂有限公司生产;氢氧化钠(NaOH),AR,湖南尔康制药有限公司生产;Tris-base(Merck)、Bis-Tris(Merck)、95%乙醇,吉林新天龙试剂有限公司生产;氯化钠(NaCl),AR,河北华晨药业有限公司生产;冰醋酸(CH<sub>3</sub>COOH),AR,台山新宁试剂有限公司生产。

### 1.2 实验方法

利用 AKTA avant 层析仪(GE Healthcare)对 Protein A 亲和层析柱捕获单克隆抗体、低 pH 孵育后的 GLP-1 进行分析,采用阴离子交换法纯化分离。采用 16 mmol/L NaCl、30 mmol/L Tris 和 30 mmol/L Bis-Tris 作为平衡液,pH 为 7,柱载量在 32~34 mg/mL 之间,在 pH 为 7 左右进行线性梯度洗脱,检测波长为 280 nm。用 1 mol/L NaCl 再生层析柱,并储存在 10 mmol/L NaOH 中。通过蛋白截短测试(Truncation)方法检测杂质的含量,对比速率、杂质去除率等,得到最优选择。

### 1.3 填料表征

利用 Nicolet iS10 傅里叶红外光谱仪测定填料组成,测量范围为 500~4 000 cm<sup>-1</sup>,测样前将填料干燥直至恒重,将干燥后的填料微球与溴化钾(KBr)粉末混合并研磨均匀,压成透明薄片。用飞纳台式扫描电镜(Phenom XL)对微球进行形貌表征,用 ImageJ 软件测定微球粒径分布。

## 2 结果与讨论

### 2.1 分离效果对比

经过 Protein A 亲和层析纯化后,样品中含有一些截短型蛋白 N-22 和 N-2 等,这些蛋白没有活性,对于目标蛋白来说属于杂质,故采用阴离子交换填料去除。上样前 GLP-1 样品中 N-22 质量分数为 4.8%,N-2 质量分数为 9.4%,目标蛋白的质量分数为 81.7%,信号肽的质量分数为 1.6%。3 种不同基质填料在 AKTA 层析仪上对 GLP-1 分离后进行 Truncation 检测,结果如表 1 所示。

表 1 不同填料分离 GLP-1 的效果对比

填料类别	序号	目标蛋白主峰收率	N-2	N-22 去除效果	信号肽
PS	1	B	C	A	A
	2	B	C	B	A
AG	1	B	C	B	A
	2	A	C	A	A
PMMA	1	A	A	A	A
	2	B	B	B	C

注:A 为优;B 为中;C 为差。

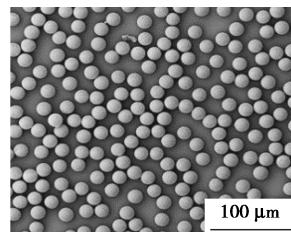
经过聚苯乙烯-二乙烯基苯类填料 PS-1 和 PS-2 层析柱分离后,样品中 N-22 质量分数由 4.8%依次下降为 0.8%和 3.0%;目标蛋白的质量分数由 81.7%上升为 85.8%和 86.7%,信号肽完全被去除,但 N-2 的分离效果较差,无法与目标蛋白有效分离。以交联琼脂糖为基质的 2 种填料(AG-1、AG-2)的分离效果为:N-22 的质量分数分别为 2.1%、2.8%;目标蛋白质量分数分别为 87.8%、85.5%,信号肽的质量分数为 0%,能够完全去除。但对 N-2 的分离效果仍旧不显著。上述 2 类基质填料对 GLP-1 的分离效果相似,无法将 N-2 杂质与目标蛋白有效分离。选取 2 种 PMMA 基质填料进行相同的分离实验,结果产生差异。使用 PMMA-2 填料检测到 0.1%的信号肽、1.8%的 N-22,相对于其他填料,信号肽无法完全去除,分离效果不理想。但 PMMA-1 却表现出优异的分离效果,目标蛋白质量分数为 89.3%,且很好地分离出 N-2,质量分数为 9.3%,这是其他填料无法实现的。信号肽也可以完全去除,N-22 质量分数为 0.7%。

通过上述对比实验可以看出,同样为强阴离子交换(季铵盐)填料,但分离效果产生很大的不同。因此,从填料的基质组成、结构以及表面微观状态进行分析获取填料性能与分离效果之间的关系具有一定的研究意义<sup>[15]</sup>。

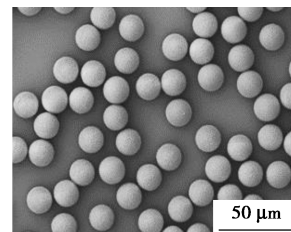
### 2.2 填料表面形貌分析

PS-DVB 基质填料的 SEM 图如图 1 所示,PS-DVB 基质填料的粒径分布图如图 2 所示。

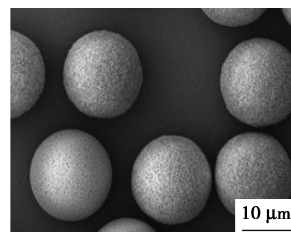
从图 1 中可以看出,同样都是聚苯乙烯-二乙烯基苯为基质的填料,其形貌结构不同,二者机械强度高,使用后表面无明显破损,PS-1 的孔隙更加致



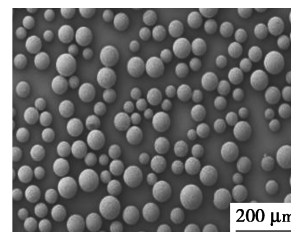
(a) PS-1(800×)



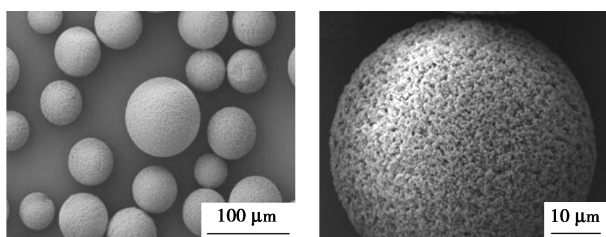
(b) PS-1(1500×)



(c) PS-1(5000×)



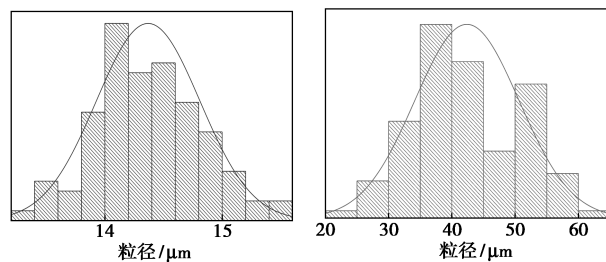
(d) PS-2(300×)



(e) PS-2(800×)

(f) PS-2(4700×)

图 1 PS-DVB 基质填料的 SEM 图



(a) PS-1

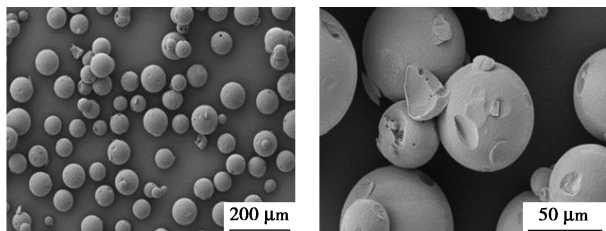
(b) PS-2

图 2 PS-DVB 基质填料的粒径分布图

密。从图 2 中可以看出,单分散的 PS-1 粒径分布集中在 14~15 μm,分布窄,高的交联度保证了填料的机械稳定性。其孔径致密,小于 200 nm,动态载量较低。虽然颗粒均一,但粒径较小,填充致密,柱压高,对生产不利。PS-2 填料粒径分布不均一,主要集中在 30~60 μm,微球表面相对粗糙,表面孔径大,内孔扩散产生微孔吸附问题。较宽的粒径分布对后压和分离阻抗都有负面影响,不利于高速液流的运行<sup>[16]</sup>。

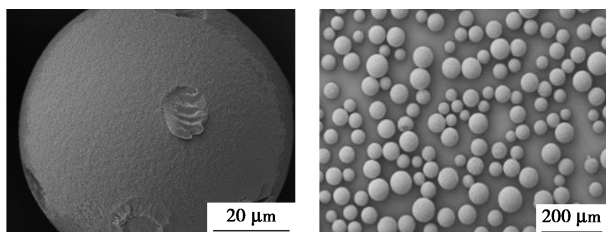
AG 基质填料的 SEM 图如图 3 所示,AG 基质填料的粒径分布图如图 4 所示。

从图 3 和图 4 中可以看出,同样都是以交联琼脂糖(AG)为基质,其形貌结构不同,但都存在机械强度低、表面出现部分破损、粒径分布宽。



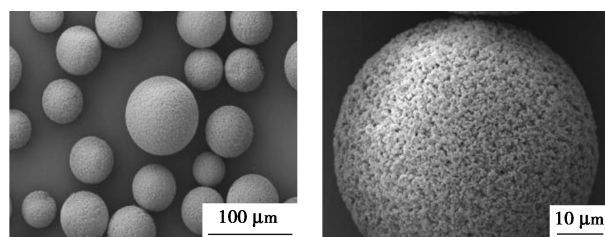
(a) AG-1(300×)

(b) AG-1(1500×)



(c) AG-1(3800×)

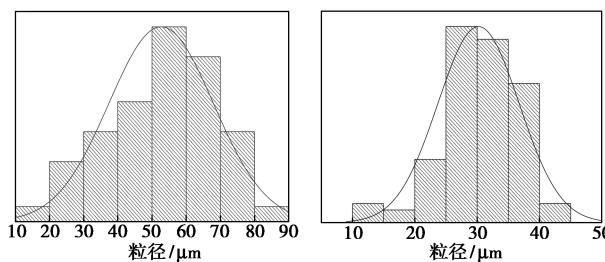
(d) AG-2(300×)



(e) AG-2(800×)

(f) AG-2(4700×)

图 3 AG 基质填料的 SEM 图



(a) AG-1

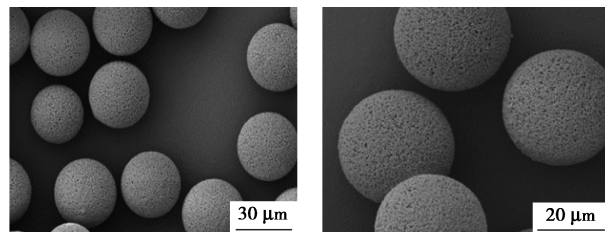
(b) AG-2

图 4 AG 基质填料的粒径分布图

粒径分布集中在 20~80 μm,AG-2 集中在 20~40 μm,球形颗粒之间的接触面积未达到最小,多孔材料的比表面积小,限制了暴露的活性位点,致使功能基团对目标物质的捕获能力下降,分离效果差。从图 3 中 AG-1 填料的破损形貌推测,填料在合成过程中有可能出现了“二次成核”甚至“多次成核”现象。此外,表面微孔致密、孔径很小,不利于对生物大分子的捕获。

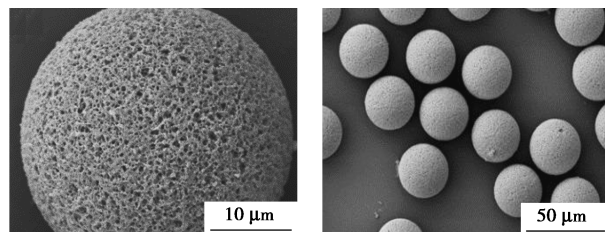
PMMA 基质填料的 SEM 图如图 5 所示,PMMA 基质填料的粒径分布图如图 6 所示。

从图 5 中可以看出,2 种填料的孔径较大,机械性能好。从图 6 中可以看出,粒径分布都非常均一,PMMA-1 的粒径分布集中在 28~30 μm,粒径分布



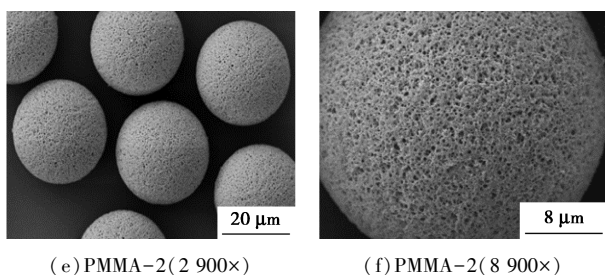
(a) PMMA-1(1900×)

(b) PMMA-1(3400×)



(c) PMMA-1(8200×)

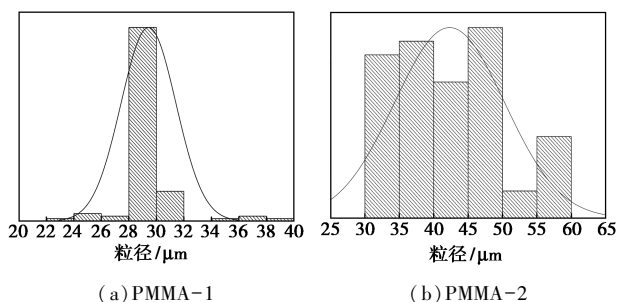
(d) PMMA-2(1500×)



(e) PMMA-2(2 900×)

(f) PMMA-2(8 900×)

图5 PMMA 基质填料的 SEM 图



(a) PMMA-1

(b) PMMA-2

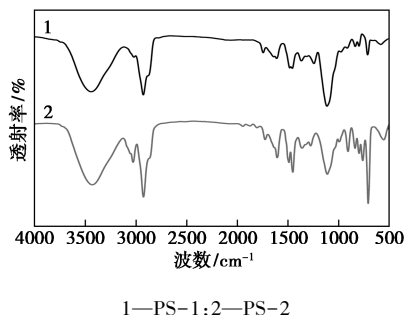
图6 PMMA 基质填料的粒径分布图

最窄,微球均匀度高,孔径集中分布在 300~500 nm 之间,蛋白质在孔隙中的传质很大程度上取决于微球的结构特征,不受流速影响<sup>[17]</sup>。PMMA-1 微球表面无明显缺陷,粒径分布的一致性更有利于高速液流的运行,特别在原位清洗和再平衡工艺中,可增加系统的通量及工作能力。PMMA-2 粒径分布宽,在 30~60 μm 之间,其对于信号肽的捕捉能力也差。

对比上述 6 种基质结构不同的填料可以看出,相对于 PMMA-1,其他 5 种填料的粒径分布都较宽。由此初步推测,粒径分布在分离效果方面起到了关键的作用。在装柱过程中,粒径分布窄的球形颗粒之间的接触面积达到最小,比表面积大,床层压力降小。此外,微球均匀,能够暴露出更多的活性位点,孔径大可提高功能基团对生物大分子的捕获能力。

### 2.3 填料组成分析

PS-DVB 基质填料的 FT-IR 谱图如图 7 所示。

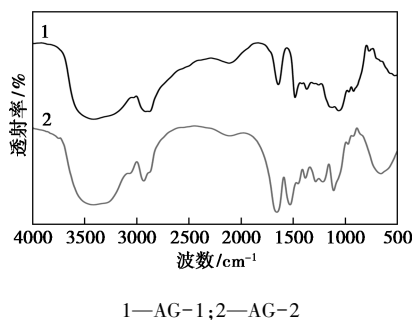


1—PS-1;2—PS-2

图7 PS-DVB 基质填料的 FT-IR 谱图

从图 7 中可以看出,2 种填料都是以聚苯乙烯-二乙烯基苯(PS-DVB)为基质,由于季铵盐没有 N—H 相关的振动,所以 3 440 cm<sup>-1</sup> 处吸收峰为 O—H 伸缩振动峰。填料在测试前虽然进行了水分的脱除,但对于比表面积很大的多孔表面,孔道内的乙醇保存液及水分很难完全脱除。此外,离子交换填料为了具有更好的生物相容性,都要进行表面亲水性改性,减少非特异性吸附,因此,羟基峰明显。3 025 cm<sup>-1</sup> 处吸收峰为苯环双键=C—H 的伸缩振动峰;2 923 cm<sup>-1</sup> 处为饱和 C—H 的伸缩振动峰。在 1 509、1 492、1 452 cm<sup>-1</sup> 附近出现的吸收峰是苯环的骨架振动引起,860~780 cm<sup>-1</sup> 之间出现吸收峰说明苯环有对位二取代;709 cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰为单取代。季铵盐虽然没有 N—H 键,但在 1 110 cm<sup>-1</sup> 处出现明显的 C—N 伸缩振动峰。

AG 基质填料的 FT-IR 谱图如图 8 所示。

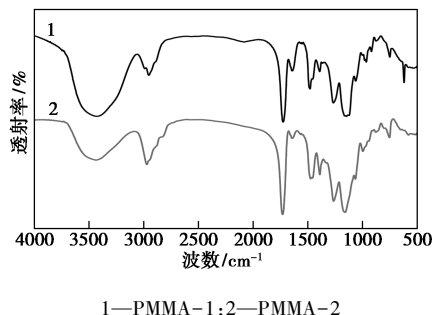


1—AG-1;2—AG-2

图8 AG 基质填料的 FT-IR 谱图

从图 8 中可以看出,以交联琼脂糖为基质的填料 AG-1 和 AG-2 主要吸收峰相似,均为典型的琼脂糖。3 400 cm<sup>-1</sup> 左右为—OH 吸收峰,是多糖的特征吸收峰;2 900 cm<sup>-1</sup> 处出现—CH<sub>3</sub>、—CH<sub>2</sub> 的特征峰;1 660 cm<sup>-1</sup> 为酯键中羰基特征吸收峰,1 360 cm<sup>-1</sup> 处有较弱的 C=O 对称吸收峰,此峰是琼脂糖中羟基化的特征吸收峰<sup>[18-19]</sup>。在 1 110 cm<sup>-1</sup> 处也出现了季铵盐明显的 C—N 伸缩振动峰。

PMMA 基质填料的 FT-IR 谱图如图 9 所示。



1—PMMA-1;2—PMMA-2

图9 PMMA 基质填料的 FT-IR 谱图

从图 9 中可以看出, 2 种填料的吸收峰也基本相似。3 400  $\text{cm}^{-1}$  处为—OH 吸收峰, 2 953  $\text{cm}^{-1}$  处为—CH<sub>3</sub>、—CH<sub>2</sub> 的伸缩振动吸收峰; 1 724  $\text{cm}^{-1}$  处吸收峰强度高, 为酯羰基的 C=O 伸缩振动特征吸收。1 266  $\text{cm}^{-1}$  和 1 146  $\text{cm}^{-1}$  处为 C—O—C 键的伸缩振动吸收峰。对比 PMMA-1 和 PMMA-2 在 1 110~1 160  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰可以看出, 由于季铵盐的 C—N 伸缩振动与 C—O—C 键的伸缩振动波长相近, 使得 PMMA-1 谱图中 1 150  $\text{cm}^{-1}$  附近峰形变宽, 说明季铵盐在 PMMA-1 表面含量高, 活性位点多。

6 种填料的 FT-IR 谱图分析可以看出, 用于生物大分子纯化分离的强阴离子交换(季铵盐)填料, 虽然其聚合物基质不同, 但其表面体现出的性质相似, 疏水性聚合物基质都进行了亲水性改性, 增强其与生物大分子的相容性。填料分离纯化性能的差异性虽然与表面键合的季铵盐官能团有关, 但在实际分离过程中, 填料微球的机械强度、表面形貌、粒径和孔径等结构因素产生了很大的影响。

### 3 结论

评价了 6 种填料分离纯化 GLP-1 的层析效果, 并对其形貌、结构、化学组成进行了分析。结果表明, PMMA-1 填料的分离纯化效果最好。通过对比分析可知, 填料粒径均匀度高、粒径分布集中(28~30  $\mu\text{m}$ )、孔径大(300~500 nm), 表面无缺陷的阴离子交换树脂对 GLP-1 具有高选择性、分辨率好。因此, 在实际生产过程中, 对于填料的选取需从表面官能团、粒径均匀度、机械强度以及表面孔径等方面进行综合对比评价。

### 参考文献

- [1] Kreyman B, Ghatei M A, Williams G, *et al.* Glucagon-like peptide-1 7-36: A physiological incretin in man[J]. *The Lancet*, 1987, 330(8571): 1300-1304.
- [2] Mojsov S, Weir G C, Habener J F, *et al.* Insulinotropin: glucagon-like peptide I(7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1987, 79(2): 616-619.
- [3] Ishihara T, Kadota T. Accelerated purification process development of monoclonal antibodies for shortening time to clinic: Design and case study of chromatography processes[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1176(1): 149-156.
- [4] 包建民, 王惠柳, 李优鑫. 高纯二氧化硅微球的制备及 HPLC 应用研究进展[J]. *现代化工*, 2018, 38(5): 16-19.
- [5] 赵禧阳, 沈一丁, 马国艳. 阳离子疏水缔合聚丙烯酰胺的合成及性能[J]. *现代化工*, 2018, 38(2): 70-74.
- [6] Gritti F, Cavazzini A, Marchetti N, *et al.* Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1157(1-2): 289-303.
- [7] Alkaskasbeh E, Maher W A, Adly F G, *et al.* The use of zirconium stationary phase to determine the four major arsenoriboses concentrations in marine organisms by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry[J]. *Microchemical Journal*, 2019, 150: 104099.
- [8] Liu J, Sun Y, Wang C, *et al.* Fabrication of monodisperse poly(allyl glycidyl ether-co-divinyl benzene) microspheres and their application in anion-exchange stationary phase[J]. *Journal of Chromatography A*, 2019, 1595: 91-96.
- [9] 乔红梅. 聚合物型色谱填料的研究进展[J]. *材料科学与工程学报*, 2016, 34(2): 333-337.
- [10] Small H, Stevens T S, Bauman W C, *et al.* Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection[J]. *Analytical Chemistry*, 1975, 47(11): 1801-1809.
- [11] Kaiser E, Rohrer J S, Jensen D, *et al.* Determination of trace anions in high-nitrate matrices by ion chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 920(1): 127-133.
- [12] Kristina S, Ulrich W, Michal K, *et al.* Comparison of small size fully porous particles and superficially porous particles of chiral anion-exchange type stationary phases in ultra-high performance liquid chromatography: Effect of particle and pore size on chromatographic efficiency and kinetic performance[J]. *Journal of Chromatography A*, 2018, 1569: 149-159.
- [13] Maya F, Estela J M, Cerda V, *et al.* Multisyringe ion chromatography with chemiluminescence detection for the determination of oxalate in beer and urine samples[J]. *Mikrochimica Acta*, 2011, 173(1): 33-41.
- [14] Zatrakha A V, Smolenkov A D, Shpigun O A, *et al.* Preparation and chromatographic performance of polymer-based anion exchangers for ion chromatography: A review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 904: 33-50.
- [15] Muller W. New ion exchangers for the chromatography of biopolymers[J]. *Journal of Chromatography A*, 1990, 510: 133-140.
- [16] Dewaele C, Verzele M. Influence of the particle size distribution of the packing material in reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 1983, 260(1): 13-21.
- [17] Pezzini J, Cabanne C, Santarelli X, *et al.* Comparative study of strong anion exchangers: Structure-related chromatographic performances[J]. *Journal of Chromatography B*, 2009, 877(24): 2443-2450.
- [18] Kondaveeti S, Prasad K, Siddhanta A K, *et al.* Functional modification of agarose: A facile synthesis of a fluorescent agarose-tryptophan based hydrogel[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 97(1): 165-171.
- [19] 王江林, 张学勤, 叶静等. 低凝固温度琼脂糖的制备与表征[J]. *现代化工*, 2017, 37(2): 120-124. ■