

高效液相色谱法测定酶转化液中 D-苯丙氨酸

宋慧敏¹, 屠春燕², 欧阳平凯²

(1. 江苏省兽药监察所, 江苏 南京 210036; 2. 南京工业大学, 江苏 南京 210009)

摘要: 采用HPLC法测定了酶转化液中的 D-苯丙氨酸、N-羧甲酰-D-苯丙氨酸和苄基海因。流动相为乙腈-20 mmol·L⁻¹磷酸二氢钾(体积比 25: 75), 用磷酸调 pH 为 5.0, 利用 DAD 检测器, 检测波长为 202 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹。用外标法进行定量分析, 三者的线性范围分别是 1.82~466 mg·L⁻¹ ($r=0.999$)、2.01~516 mg·L⁻¹ ($r=0.999$)、1.94~496 mg·L⁻¹ ($r=0.999$), 回收率为 99.9%~100.1%、99.8%~100.0%、99.5%~100.4%, RSD($n=6$) 分别为 1.8%、1.6%、1.0%, 检出限为 18.7、2.41、64.6 pg。实验结果表明该法简便、快速、结果可靠。

关键词: 高效液相色谱; D-苯丙氨酸; N-羧甲酰-D-苯丙氨酸; 苄基海因

中图分类号: O657.72; Q517 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2005)02-0095-03

Determination of D-Phenylalanine in Enzymatic Reactants with HPLC

SONG Hui_min¹, TU Chun_yan², OUYANG Ping_kai²

(1. Jiangsu Provincial Institute for Veterinary Drug Control, Nanjing 210036, China;

2. Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: An HPLC method was developed to determine the contents of D-phenylalanine, N-carbamyl-D-phenylalanine and benzylhydantoin in enzymatic reactants. Potentially influential factors, such as the proportion of organic solvent, concentration and type of inorganic salt, and pH, were studied. The optimal chromatographic parameters were determined as follows. Chromatographic column: Eclipse×CB-C8(5 μm, 150×4.6 mm); mobile phase: acetonitrile-20 mmol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate(25: 75 by volume), adjust pH to 5.0 with phosphoric acid; detective wavelength: 202 nm; flow rate: 1.0 mL·min⁻¹. Under these conditions and with peak areas being used for quantification with external calibration, the linear calibration ranges for the three target analytes were 1.82~466, 2.01~516, and 1.94~496 mg·L⁻¹ (all with $r=0.999$), respectively. The recoveries of the analytes from spiking experiments were 99.9%~100.1%, 99.8%~100.0%, and 99.5%~100.4%, respectively, with relative standard deviations($n=6$) being 1.8%, 1.6%, and 1.0%. The minimum detectable qualities were 18.7, 2.4, 64.6 pg, respectively. The method is rapid, convenient and accurate.

Key words: HPLC; D-phenylalanine; N-carbamyl-D-phenylalanine; Benzylhydantoin

苯丙氨酸是人体 8 种必需氨基酸之一, 具有旋光性。人体能利用的是 L-苯丙氨酸, 且目前工业上生产的也大多是 L-苯丙氨酸, 而关于苯丙氨酸的另一种消旋异构体 D-苯丙氨酸的研究和生产方面的报道目前还不多。D-苯丙氨酸的应用非常广泛, 作为医药中间体, 它具有良好的靶向作用; 以 D-苯丙氨酸为原料合成的多肽类物质可作为凝血剂和抗凝血剂; D-苯丙氨酸还可用于止痛药和镇静剂; 它的抑制效应在慢性心血管疾病治疗方面有一定作用; 作为脑啡肽的抑制药剂, 在一些疾病治疗方面也具有一定的疗效^[1]。另外, D-苯丙氨酸还是抗菌素如杆菌肽、多粘菌素、短杆菌肽等的组分^[2]。

目前, 日本在 D-氨基酸的生产上处于领先地位, 而国内关于 D-苯丙氨酸的生产研究还十分薄弱。D-苯丙氨酸的制备方法主要包括不对称合成法和化学-酶法, 其中尤以化学-酶法之一菌双酶法为最佳, 该法是利用同时含有海因水解酶与羧甲酰基氨基酸水解酶的菌株, 以苄基海因为底物, 一步生成 D-苯丙氨酸。该法由于工艺路线简单, 反应条件温和, 收率高, 能耗低, 具有广阔的发展前景。而关于酶转化液中 D-苯丙氨酸及其共存组分的测定方法迄今未见报道, 本文针对一菌双酶法生产 D-苯丙氨酸的酶转化体系, 建立了一种高效、实用的液相色谱分析方法, 用于生产过程中底物、产物及副产物的监

收稿日期: 2004-03-11; 修回日期: 2004-11-05

作者简介: 宋慧敏(1978-), 女, 河南周口人, 硕士, Tel: 025-86263757, E-mail: shmlja@hotmail.com

控,同时也为反应条件优化提供了依据。该法简单、快捷、准确、重现性好,有推广价值。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

HP1100 液相色谱仪,配有 DAD 检测器,美国惠普公司。

D-苯丙氨酸、*N*-氨甲酰-*D*-苯丙氨酸、苄基海因对照品:由南京工业大学生化重点实验室提供(纯度大于 99.5%);乙腈:HPLC 级,Tedia Company。

本文中所述的水均为石英亚沸双蒸水,磷酸、磷酸二氢钾及其它试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件

色谱柱: Eclipse × CB- C8(5 μm, 150 × 4.6 mm); 流动相: 乙腈-20 mmol · L⁻¹ 磷酸二氢钾(体积比 25: 75), 用磷酸调 pH 为 5.0; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 202 nm; 进样量: 20 μL。

1.3 实验方法

1.3.1 流动相的配制 称取磷酸二氢钾适量,配成浓度为 20 mmol · L⁻¹ 的水溶液,与乙腈以 75: 25(体积比)的比例混合,用磷酸调 pH 为 5.0,混匀抽滤,用超声振荡脱气后待用。

1.3.2 对照品溶液的配制 精密称取 *D*-苯丙氨酸、*N*-氨甲酰-*D*-苯丙氨酸、苄基海因对照品适量,用流动相溶解并配制成混合液,使混合液中各物质的质量浓度均为 50.0 mg · L⁻¹,经 0.2 μm 的水系滤膜过滤后备用。

1.3.3 供试品溶液的配制 取酶转化液(由南京工业大学生化重点实验室提供)数份,分别用流动相稀释至其质量浓度约为 0.05 g · L⁻¹,经 0.2 μm 的滤膜过滤后备用。

1.3.4 测定 在 1.2 所述条件下,待色谱柱平衡后,用微量进样器将对照品和供试品溶液分别注入高效液相色谱仪,根据相应峰面积用外标法计算各物质含量。对照品及样品色谱图见图 1。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

2.1.1 流动相中有机溶剂的选择 经过波长扫描及多次实验,选用 202 nm 作为检测波长,而在较低的波长下,乙腈比其它有机溶剂的背景干扰要小很多,因此选用乙腈作为流动相的有机部分。通过考察乙腈与磷酸二氢钾溶液不同配比时各组分的保留时间、峰形及分离度,最终确定二者的体积比为 25: 75。

2.1.2 流动相中无机盐浓度对分离的影响 分别配制 10、20、50 mmol · L⁻¹ 的磷酸二氢钾溶液,与乙腈以

75: 25(体积比)混合作流动相。结果发现,当磷酸二氢钾为 10 mmol · L⁻¹ 时,*D*-苯丙氨酸的谱峰较宽,与 *N*-氨甲酰-*D*-苯丙氨酸不能完全分开,会给定量测定带来误差。而磷酸二氢钾为 20、50 mmol · L⁻¹ 时分离效果较好。随无机盐浓度的增大,*D*-苯丙氨酸的保留值增大,而 *N*-氨甲酰-*D*-苯丙氨酸及苄基海因的保留值几乎不变,且 *N*-氨甲酰-*D*-苯丙氨酸和 *D*-苯丙氨酸的分离度也逐渐增大,但盐浓度过大时,容易堵塞柱子和管路,给仪器清洗和维护带来困难。因此我们选择磷酸二氢钾的浓度为 20 mmol · L⁻¹。

2.1.3 流动相中无机盐种类的影响 分别配制 20 mmol · L⁻¹ 磷酸二氢钾、磷酸二氢铵、磷酸二氢钠的水溶液,其余条件同前,试验缓冲盐种类的影响。实验发现,这 3 种磷酸盐缓冲液均能得到良好的效果。

2.1.4 pH 的影响 配制 20 mmol 磷酸二氢钾溶液,分别用磷酸调其 pH 为 5.0、4.0、3.0,其余条件同前,试验 pH 的影响。结果发现,流动相中加入磷酸后,*D*-苯丙氨酸峰的保留值变大,但随着磷酸的继续加入,其保留值几乎不再有大变化。未加磷酸时,*D*-苯丙氨酸峰和样品中一杂质峰相重叠,给测定结果带来误差;而加入磷酸后,二者能得到较好的分离。多次实验表明,流动相的 pH 选择在 5.0 为最佳。

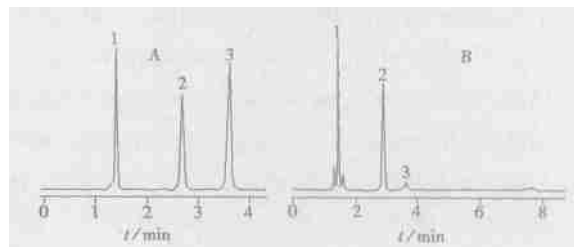


图 1 对照品(A)及样品(B)的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of a reference substance(A) and sample(B)

1. *N*-氨甲酰-*D*-苯丙氨酸(*N*-carbamyl-*D*-phenylalanine); 2. *D*-苯丙氨酸(*D*-phenylalanine); 3. 苄基海因(benzylhydantoin)

2.2 实验方法的验证

2.2.1 方法线性范围 按 1.3.2 配制 7 个不同浓度的对照品溶液, 在 1.2 所述条件下进行测定, 以两次平行测定的平均值作为测定结果。以峰面积与对照品浓度作线性回归, 回归方程及相关系数如表 1 所示。

表 1 方法线性范围
Table 1 Linear calibration ranges

Sample	Linear range $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Regression equation*	Relative coefficient r
<i>D</i> -Phenylalanine(<i>D</i> -苯丙氨酸)	1.82~466	$y = 7.01 \times 10^{-3}x - 4.77 \times 10^{-4}$	0.999
<i>N</i> -Carbonyl- <i>D</i> -phenylalanine(<i>N</i> -氨甲酰- <i>D</i> -苯丙氨酸)	2.01~516	$y = 7.95 \times 10^{-3}x - 2.48 \times 10^{-3}$	0.999
Benzylhydantoin(苄基海因)	1.94~496	$y = 6.07 \times 10^{-3}x - 1.94 \times 10^{-4}$	0.999

* $x: \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}, n = 7$

2.2.2 方法准确度 采用标准加入法考察方法准确度。取已知含量的酶转化液一份, 分别加入高、中、低 3 种含量的对照品混合液, 按 1.2 及 1.3 所述方法和条件进行测定, 以 6 次进样测定的平均值计算, 测定结果如表 2 所示。从表 2 可看出, 此法具有很好的准确度。

表 2 回收率测定
Table 2 Recovery result

Compound	Original $\rho_0 / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Added $\rho_A / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Found $\rho_F / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery $R / \%$
<i>D</i> -Phenylalanine (<i>D</i> -苯丙氨酸)	32.8	1.86	34.66	99.9
		9.32	42.12	100.1
		93.2	126.3	99.8
<i>N</i> -Carbonyl- <i>D</i> -phenylalanine (<i>N</i> -氨甲酰- <i>D</i> -苯丙氨酸)	33.7	2.06	35.74	99.8
		10.3	43.99	100.0
		103	137	100.0
Benzylhydantoin (苄基海因)	2.26	1.98	4.22	99.5
		9.92	12.22	100.2
		99.2	101.4	100.4

2.2.3 方法精密度 取对照品溶液连续进样 6 次, 按峰面积进行计算, 得出 *D*-苯丙氨酸、*N*-氨甲酰-*D*-苯丙氨酸、苄基海因的 RSD 分别为 1.8%、1.6%、1.0%, 证明仪器精密度良好。

2.2.4 检出限 配制一系列浓度的对照品溶液, 在选定的色谱条件下进样, 以相当于基线噪音的 3 倍信号相应的浓度为最低检测浓度, 测得 *D*-苯丙氨酸、*N*-氨甲酰-*D*-苯丙氨酸、苄基海因的检出限分别为 18.7、2.41、64.55 μg 。

参考文献:

- [1] JIN Yuxing. [D]. Dissertation for Master Degree(金宇兴. [D]. 硕士学位论文), 南京化工大学, 2001.
[2] FAN Zhenji. [J]. Amino Acids(范镇基. [J]. 氨基酸杂志), 1985, 4: 38-49.

(上接第 94 页)

- [2] ZHU Lusheng. [J]. Advances in Environmental Science(朱鲁生. [J]. 环境科学进展), 1995, 3(4): 64-71.
[3] LI Jie, SI Jiliang. [J]. Journal of Environment and Health(李杰, 司纪亮. [J]. 环境与健康杂志), 2002, 19(1): 83-84.
[4] LI Benchang. Handbook of Applied Detecting Methods for Pesticide Residues[M]. Beijing: Chemical Industry Press(李本昌. 农药残留量实用检测方法手册[M]. 北京: 化学工业出版社), 2001. 241-259.
[5] YANG Yongzhen. Standards Assembly for Maximum Residue Limits of Pesticides[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press(杨永珍. 农产品农药残留限量标准汇编[M]. 北京: 中国农业出版社), 2001. 1.
[6] MARSHALL W D. [J]. J Agric Food Chem, 1982, 30: 649-652.