

柱前衍生化 高效液相色谱法跟踪检测酶法制备 γ -D-谷氨酰-L-色氨酸反应过程

屠春燕* 吴燕娇 袁艳娟 姚忠 唐美华 韦萍

(南京工业大学生物与制药工程学院, 南京 210009)

摘 要 γ -D-谷氨酰-L-色氨酸 (SCV-07) 是一种新型广谱免疫调节类化合物。针对酶法合成 SCV-07 反应体系的特点, 以邻硝基苯磺酰氯为柱前衍生试剂, RP-HPLC 为分离模式, 选用 Lichrospher C₁₈ 柱, 20 mmol/L 磷酸盐溶液 (pH 3.0) 和乙腈为流动相, 梯度洗脱, 检测波长 230 nm, 建立了同时分析测定多种氨基酸和小肽的方法, 所有组分于 15 min 内洗脱完毕。氨基酸及二肽在 0.96 ~ 260 μ mol/L 范围内线性良好, 相关系数大于 0.9991; 加标回收率在 97.8% ~ 101.6% 之间; 相对标准偏差为 1.2% ~ 2.9%。本方法适用于 SCV-07 产品的纯度分析, 以及酶法转肽制备 SCV-07 反应过程跟踪检测, 具有分析速度快、准确度高、操作简单等优点。

关键词 色氨酸, 邻硝基苯磺酰氯, 衍生化, 反相高效液相色谱

1 引言

γ -D-谷氨酰-L-色氨酸 (γ -D-Glutamyl-L-tryptophan, SCV-07) 是一种新型广谱免疫调节类化合物, 作用类似胸腺素 α 1, 在老鼠体内进行的实验已证实了它对抗肺结核病的生物活性^[1]。Suzuki 等^[2]在 2004 年最早建立了酶法合成 SCV-07 技术, 近年来国内也有相关的报道^[3,4]。该方法是利用 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -Glutamyl transpeptidase, γ -GT, E.C. 2.3.2.2) 的 γ -谷氨酰基化反应制备小肽, 但在反应中当以 L-谷氨酰胺 (L-Glutamine, L-Gln) 为谷氨酰供体时, 存在一定程度的自转肽反应^[5], 同时, γ -GT 还可以 SCV-07 为谷氨酰供体, 并生成相应的氨基酸, 且这一水解过程是不可逆的^[2,3], 这导致转肽反应过程中目的产物 SCV-07 转化率降低, 同时也使酶法制备 SCV-07 的反应体系复杂化。因此建立快速、可行的分析方法监控反应进程以获得高收率、高纯度的谷色二肽极为重要。

柱前衍生高效液相色谱法是小肽或氨基酸分析的主要方法, 方法的关键在于衍生剂的选择。目前, 常用的衍生剂主要有邻苯二甲醛^[6]、氯甲酸苄甲酯^[8]、丹酰氯^[9]及二硝基氟苯^[10]等, 这些方法均存在一定的缺陷^[11], 且所建立的方法大多侧重于分析产品, 用于同时监测酶反应体系中的氨基酸和小肽的方法尚未见报道。本研究采用邻硝基苯磺酰氯为柱前衍生试剂, 以酶法制备 SCV-07 的反应体系为分析对象, 建立一种用于跟踪检测反应过程的分析方法, 以求推广到其它同类反应过程的检测分析。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Beckman 126/166 型高效液相色谱仪 (美国 Beckman-Coulter 公司); 邻硝基苯磺酰氯 (江苏中意化工技术开发研究所提供); γ -GT (南京工业大学材料化学工程国家重点实验室提供); SCV-07 (南京工业大学生物与制药工程学院小肽合成室自制, 纯度 > 99.9%); D-谷氨酰胺 (D-Glutamine, D-Gln)、L-色氨酸 (L-Tryptophan, L-Tip)、L-谷氨酸 (L-glutamic acid, L-Glu, 上海国药集团); 乙腈 (色谱纯, Merker 公司); 其它试剂均为国产分析纯。

2.2 实验方法

2.2.1 标准品衍生化方法^[12] 准确称取各标准品, 用 0.1 mol/L HCl 溶解, 配制成储备液 (D-Gln 及 L-Glu 的浓度约为 3 mmol/L, SCV-07 及 L-Tip 的浓度约为 1 mmol/L)。移取 50 μ L 混合储备液置于 2 mL 的具塞磨口试管内, 依次加入硼酸缓冲液 (0.05 mmol/L, pH 9.0) 1 mL, 邻硝基苯磺酰氯的乙醇溶液

200-02-19 收稿; 2009-05-13 接受

* E-mail: tcy7341@126.com

(40 mmol/L) 80 μ L,混匀,塞紧后于 30 $^{\circ}$ C 水浴中衍生反应 30 min后,以 8000 r/min离心 10 min,待用。

2.2.2 样品衍生化方法 终止反应后的酶反应液高速离心,取上清液,适当稀释,按 2.2.1方法衍生处理。

2.2.3 色谱条件 Lichrospher C₁₈柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相 A 为 20 mmol/L 磷酸盐溶液 (pH 3.0),流动相 B 为乙腈;洗脱梯度: 25%B $\xrightarrow{0 \rightarrow 13 \text{ min}}$ 95%B;流速: 1 mL/min; 进样量: 20 μ L;检测波长选择在二肽及氨基酸衍生产物的最大吸收 230 nm处;室温。

3 结果与讨论

3.1 缓冲盐种类及 pH 值的选择

实验对醋酸缓冲盐-乙腈体系、磷酸缓冲盐-乙腈体系进行考察,最后确定以磷酸缓冲盐-乙腈作为流动相。其中缓冲盐的 pH对分离的影响较大, pH $\approx$ 5时,谷氨酸保留较短,与衍生试剂水解产物分离度不佳;当缓冲盐 pH $\approx$ 3.0时,谷氨酸保留时间增大且各组分均达到基线分离 (图 1)。

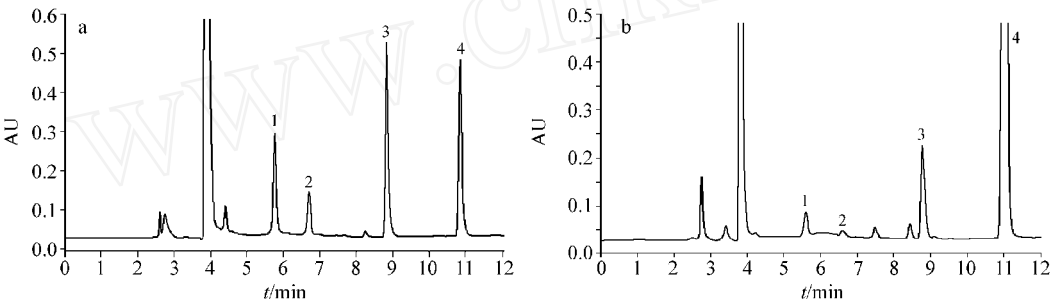


图 1 标准品 (a)和酶反应液 (b)色谱图

Fig 1 Chromatogram of standard sample(a) and reaction solution(b)

1. Glutamine (Gln); 2. Glutamic acid (Glu); 3. γ -D-Glutamyl-L-tryptophan (SCV-07); 4. L-Tryptophan (Tyr).

3.2 衍生方法重复性考察

本实验考察了邻硝基苯磺酰氯与氨基酸及小肽的衍生化反应的稳定性。取 6份相同的氨基酸和小肽的混合标准溶液,按 2.2.1和 2.2.3方法衍生并测定, D-Gln, L-Glu, SCV-07和 L-Tyr的衍生产物响应峰面积的 RSD分别为 3.0%, 2.5%, 3.8%和 4.1%,说明此衍生方法重复性良好。

将混合样品衍生反应液在室温下保存 2 d后测定。结果显示,各衍生产物的峰形、峰面积、保留时间等无明显差异,各组分衍生产物测定结果的 RSD均 <2%,表明此衍生产物具有良好的稳定性。

3.3 标准曲线、准确度、精密度及检出限

配制系列标准溶液,按 2.2.1和 2.2.3方法衍生并测定,回归方程及检出限 (S/N = 3.1)见表 1。

表 1 回归方程、相关系数、检出限、回收率及精密度

成分 Component	线性范围 Linear range (μ mol/L)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	检出限 Detection limit (μ mol/L)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%, n = 6)
谷氨酰胺 Gln	2.8 ~ 260	$y = 0.095x + 0.1912$	0.9991	14.7	101.2	1.2
谷氨酸 Glu	2.8 ~ 260	$y = 0.0547x + 0.0259$	0.9994	32.1	101.6	2.9
二肽 SCV-07	1.0 ~ 95	$y = 0.3988x + 0.7748$	0.9992	3.5	98.2	2.7
色氨酸 Tyr	0.96 ~ 88	$y = 0.4655x - 0.388$	0.9991	3.7	97.8	2.6

在已知成分的酶反应液中分别加入高、中、低 3种不同浓度的氨基酸及二肽标准混合液,混匀,衍生化后进样分析,考察分析方法的回收率和相对标准偏差 (表 1)。结果表明,回收率在 97.8% ~ 101.6%范围内,相对标准偏差为 1.2% ~ 2.9%。

3.5 酶法制备 SCV-07的反应过程分析

称取适量 L-Tyr和 D-Gln溶于 pH 10.0的缓冲液,混匀;加入适量酶液,40 $^{\circ}$ C下反应^[3],按一定时间间隔取适量反应液,加等体积三氯乙酸 (10%, V/V)终止反应,按 2.2.2方法进行处理, HPLC分析各组分浓度,以考察在酶转化过程中底物和产物的变化趋势,确定最适反应条件。

从图 2 可以看出,随着反应的进行,底物产物 *L*-Trp 和 *D*-Gln 浓度下降,产物 SCV-07 与 Glu 的浓度逐渐升高,结果表明: γ -GT 不仅通过其转肽活性生成了二肽,同时在反应过程中存在 γ -GT 对产物 SCV-07 的水解作用,这为深入了解此类反应的作用机理,有效控制反应进程提供了有益的借鉴。

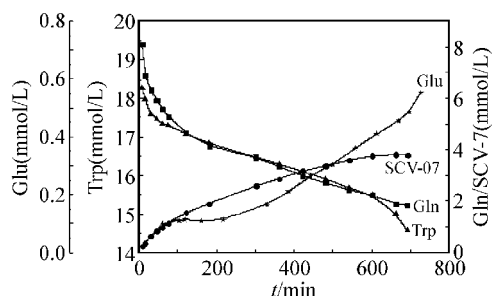


图 2 酶法合成 SCV-07 的进程曲线

Fig 2 Conversion process of SCV-07 by enzymatic synthesis procedure

References

- 1 Alexander A K, Andrey S S, Sergey V K. USP, 5744452, 1999
- 2 Suzuki H, Kato K, Kumagai H. *Journal of Biotechnology*, 2004, 111(3): 291 ~ 295
- 3 Wang Qian (汪前), Yao Zhong (姚忠), Xun Zhi-Jin (荀志金), Xu Xiao-Ying (徐晓滢), Xu Hong (徐虹), Wei Ping (韦萍). *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities* (高校化学工程学报), 2008, 22(2): 288 ~ 293
- 4 Wang Qian (汪前), Yao Zhong (姚忠), Wu Ming-Gang (吴明刚), Xun Zhi-Jin (荀志金), Zhou Zhi (周治), Xu Hong (徐虹), Wei Ping (韦萍). *Journal of Chemical Industry and Engineering* (化工学报), 2008, 59(2): 431 ~ 436
- 5 Keillor J W, Castonguay R, Lherbet C, Helmut S, Lester P. *Methods in Enzymology*, 2005, 401: 449 ~ 467
- 6 Pereira V, Pontes M, Camara J S, Marques J C. *J. Chromatogr. A*, 2008, 1189(1-2): 435 ~ 443
- 7 Láz-Cervantes J, Sánchez-Machado D I, Rosas-Rodríguez J A. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1105(1-2): 106 ~ 110
- 8 Qu Q S, Tang X Q, Wang C Y, Yang G J, Hu X Y, Lu X, Li Y, Li S C, Yan C. *Anal. Chim. Acta*, 2006, 572(2): 212 ~ 218
- 9 Maraschiello C, Miranda E, Millán E, Floriano P, Vilageliu J. *J. Chromatogr. B*, 2003, 791: 1 ~ 11
- 10 Yu Hong (于泓), Mu Shi-Feng (牟世芬). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), 2005, 33(3): 398 ~ 404
- 11 Tu Chun-Yan (屠春燕), Zhao Jun (赵珺), Ge Jia-Lu (葛佳璐), Wu Yan-Jiao (吴燕娇), Tang Mei-Hua (唐美华), Li Shou-Chun (李寿椿). *Journal of Instrumental Analysis* (分析测试学报), 2008, 27(7): 681 ~ 685

Analysis of γ -D-Glutamyl-L-tryptophan in Enzymatic Synthesis Procedure by High Performance Liquid Chromatography

TU Chun-Yan*, WU Yan-Jiao, YUAN Yan-Juan, YAO Zhong, TANG Mei-Hua, WEI Pin

(Institute of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009)

Abstract γ -D-Glutamyl-L-tryptophan (SCV-07) is a prospective medicine for the treatment of tuberculosis. The RP-HPLC method was used to analyze the practical system of SCV-07 by enzymatic synthesis from *D*-glutamine and *L*-tryptophan. Under the optimal conditions, the chromatographic conditions were as follows: Lichrospher C₁₈ column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) was used, the detection wavelength was 230 nm. Flow rate was 1.0 mL/min; mobile phase A was 20 mmol/L sodium dihydrogen phosphate (pH 3.0), mobile phase B was ACN; the gradient protocol was applied. All compounds were completely eluted in 15 min. The linear relationship was obtained between peak area and concentration for *D*-Gln, *L*-Glu, SCV-07 and *L*-Trp with correlation coefficients higher than 0.9991. The recoveries of the analyses from spiking experiments were 97.8% - 101.6%, with relative standard deviations being 1.2% - 2.9%. This method is fast, accurate, sensitive, and easy to run.

Keywords γ -D-Glutamyl-L-tryptophan, *o*-nitro benzenesulfonyl chloride, derivatization, reversed phase high performance liquid chromatography

(Received 19 February 2009; accepted 13 May 2009)