

青霉素酰化酶制备光学纯 β -苯丙氨酸的HPLC分析

李登超

(淮阴师范学院生命科学学院, 江苏淮安 223300)

摘要:建立了青霉素酰化酶制备光学纯 β -苯丙氨酸(BPA)过程中各成分的 HPLC 分析方法。用 Zorbax XDB-C₁₈ 柱在流动相为含 35% (v/v) 乙腈的 7mmol/L pH 3.0 磷酸缓冲液(含 SDS 0.68g/L), 流速为 1.0mL/min, 柱温 30℃, 检测波长为 210nm 等条件下, 四种物质苯乙酰胺、BPA、N-苯乙酰-BPA、苯乙酸可以被有效分离, 且在 $\leq 0.2\text{mg/mL}$ 浓度下, 四种物质含量与出峰面积均呈良好的线性相关。用 Chirobiotic T 和 Chirobiotic R 手性柱分别对手性物质 N-苯乙酰-BPA 和 BPA 的对映异构体进行了分离检测, 并确定了最佳的洗脱条件。

关键词:青霉素酰化酶, β -苯丙氨酸, 光学纯, 高效液相色谱法

Analysis of optically pure β -phenylalanine produced by penicillin G acylase through HPLC

LI Deng-chao

(School of Life Sciences, Huaiyin Teacher College, Huaian 223300, China)

Abstract: Feasible HPLC methods were developed to measure some compounds in reaction of optically pure β -phenylalanine (BPA) produced by penicillin G acylase. Four substances, i.e. phenylacetamide, BPA, N-phenylacetyl-BPA and phenylacetic acid could be detected effectively using Zorbax XDB-C₁₈ column under the following elution conditions: mobile phase was 7mmol/L phosphate (pH 3.0), containing acetonitrile 35% (v/v) and SDS 0.68g/L, 1mL/min flow rate with detection wavelength 210nm. When all their concentrations were under 0.2mg/mL, contents of four substances had good linear correlation with their own peak area. Enantiomers of two chiral compounds, i.e. N-phenylacetyl-BPA and BPA could be detected under the optimum elution conditions using Chirobiotic T and Chirobiotic R columns, respectively.

Key words: penicillin G acylase; β -phenylalanine; optically pure; HPLC

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)05-0368-03

光学纯 β -苯丙氨酸(BPA), 具有重要的生物和医学用途, 如酶抑制剂^[1]和 β -抗生素^[2], 抗癌药物紫杉醇的侧链是羟基化的 BPA, 侧链对紫杉醇发挥抗癌作用是不可缺少的^[3]。近年来, 用生物法制备光学纯 BPA 及其衍生物的研究备受青睐。青霉素酰化酶(PGA, EC.3.5.1.11)是在青霉素 G 钾盐裂解成 6-氨基青霉烷酸(6-APA)和侧链羧酸过程中起关键作用的酶, 在医药工业广泛应用其水解酶特性生产 6-APA^[4], 而且 PGA 还具有酰化酶的特性^[5-8]。我们在利用 PGA 酰化酶特性拆分外消旋 BPA 时, 发现 PGA 能专一性地酰化一种对映体, 另一对映体形式不被酰化, 通过进一步分离纯化得到两种不同光学活性的 BPA^[9]。但在酰化反应过程中涉及到四种物质, 即两种底物 BPA 和苯乙酰胺, 两种产物 N-苯乙

酰-BPA 和苯乙酸。由于四种物质都具有苯环结构, 在紫外区都有光吸收, 而且苯乙酰胺和 BPA 都含有 $-\text{NH}_2$, 因此, 很难用常规的显色方法来定量检测其中任何一种物质的含量, 进而影响到对反应过程的分析。另外, BPA 和 N-苯乙酰-BPA 都是手性物质, 具有对映异构体, 所以建立分离两种物质对映异构体的方法对定量调控反应过程和分析产物的光学纯度显得尤为重要。因此, 本文尝试利用高灵敏度的 HPLC 对其进行分离检测, 建立 HPLC 分析方法, 以期对相关领域的研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

BPA 标准品 Sigma 公司; BPA、N-苯乙酰-BPA 实验室自行合成, 经色谱鉴定其纯度分别大于 99% 和 98%; 其他试剂 均为市售分析纯。

Zorbax XDB-C₁₈ 柱 4.6mm $\times$ 250mm, 5 μm ,

收稿日期: 2009-04-02

作者简介: 李登超 (1976-), 男, 讲师, 研究方向: 生物化工。

分析检测

Agilent; Chirobiotic T 手性柱 4.6mm × 250mm, 5 μ m, ASTEC; Chirobiotic R 手性柱 4.6mm × 150mm, 5 μ m, ASTEC; 0.45 μ m 水相和有机过滤膜 上海源聚生物科技有限公司; 1100 series 高效液相色谱仪 Agilent; THX-05 温度控制仪, XT4A 显微熔点仪, WZZ-1S 自动旋光仪等。

1.2 实验方法

1.2.1 四种物质的分离检测 反应过程反应液中各组成的含量分析通过装有 XDB-C₁₈ 柱的 Agilent 1100 系列 HPLC 液相色谱系统。流动相为含 35% (v/v) 乙腈的 7mmol/L pH 3.0 磷酸缓冲液 (含 SDS 0.68g/L), 流速为 1.0mL/min, 柱温 30℃, 检测波长为 210nm。

1.2.2 标准曲线绘制 准确配制 2mg/mL 的 BPA、N-苯乙酰-BPA、苯乙酸和苯乙酰胺母液, 分别取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1mL 母液于 10mL 容量瓶中, 用双蒸水定容, 微膜过滤。上样量 10 μ L, 用 XDB-C₁₈ 柱按照上述方法进行 HPLC 分析检测, 以峰面积为纵坐标, 以四种物质的浓度为横坐标, 分别制定了标准曲线, 在 0.2mg/mL 浓度以下, 四种物质的峰面积与浓度成很好的线性相关 (图 1)。

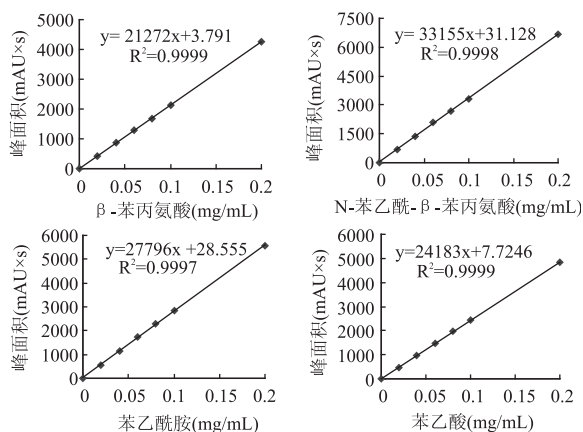


图1 HPLC测定四种物质的标准曲线图

1.2.3 N-苯乙酰- β -苯丙氨酸的对映体含量分析 通过装有 Chirobiotic T 手性柱的 Shimadzu LC-10Avp 液相色谱系统。流动相为 35% 乙腈和 65% 20mM 磷酸缓冲液 (pH 5.5), 流速为 1.0mL/min, 柱温 20℃, 检测波长 210nm。

1.2.4 β -苯丙氨酸的对映体含量分析 通过装有 Chirobiotic R 手性柱的 Shimadzu LC-10Avp 液相色谱系统。流动相为甲醇:醋酸:三乙胺 = 100:0.4:0.1, 流速为 0.4mL/min, 柱温 10℃, 检测波长 254nm。

2 结果与分析

2.1 XDB-C₁₈柱检测四种物质的图谱

采用安捷伦 Zorbax XDB-C₁₈ 柱, 7mmol/L pH3.0 缓冲盐 (含 0.68g/L SDS), 分别用含乙腈 30%、35%、40% 的流动相进行四种物质分离检测。当流动相中的乙腈含量为 30% 时, 能将苯乙酰胺、苯乙酸、N-苯乙酰-BPA、BPA 完全分开, 出峰时间分别为 3.7、6.8、12.5、26.5min; 当乙腈含量为 35% 时, 四种物质的出峰时间分别为 3.2、5.2、7.6、10.7min, 分离度均大于 1.5, 都能完全分开; 进一步提过乙腈含量为 40%, 由于出峰时间太快, N-苯乙酰-BPA、BPA 的出峰时间

重叠, 不能分开。因此确定流动相组成为含 35% (v/v) 乙腈的 7mmol/L pH 3.0 磷酸缓冲液 (含 SDS 0.78g/L)。典型的四种物质的 HPLC 分离图谱如图 2 所示。

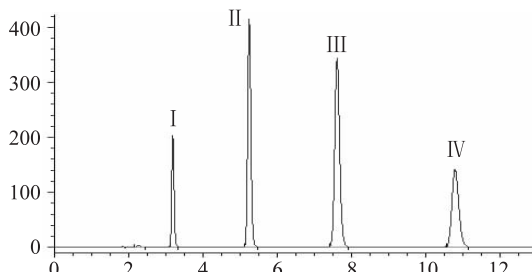


图2 XDB-C₁₈柱分离检测四种物质的色谱图

I. 苯乙酰胺; II. 苯乙酸; III. N-苯乙酰-BPA; IV. BPA

2.2 Chirobiotic T 手性柱分离消旋的 N-苯乙酰- β -苯丙氨酸

由表 1 可知, 在流动相比例为甲醇:醋酸缓冲液 = 20:80 (v/v) 时, 分离度最高; 但由于 pH 偏高和流速较大等原因, S-和 R-构型的 N-苯乙酰-BPA 出峰时间都较早。图 3 显示了不同 pH 对消旋的 N-苯乙酰-BPA 分离的影响, 可以看出, 当 pH = 5.5 时, 色谱图的基线平稳, 峰形对称, 分离效果较好。因此确定最佳洗脱条件: 甲醇:醋酸缓冲液 (pH 5.5) = 20:80 (v/v), 流速 0.5mL/min, 检测波长 210nm、温度 20℃。在此条件下两种构型的 N-苯乙酰-BPA 实现了完全分离, 分离度为 1.89。N-苯乙酰-(S)-BPA 和 N-苯乙酰-(R)-BPA 的出峰时间分别为 9.4、10.7min。

表1 不同甲醇:醋酸缓冲液比例
对消旋 N-苯乙酰-BPA 分离度的影响

甲醇:缓冲液 (v/v)	t_s	t_R	分离度
10:90	4.9	5.4	1.28
15:85	3.9	4.4	1.29
20:80	3.5	4.5	1.47
25:75	3.4	3.8	1.40

注:洗脱条件:pH = 6.5, 流速 1.0mL/min, 检测波长 210nm, 温度 20℃; 其中 t_s 和 t_R 分别为 S-和 R-构型 N-苯乙酰-BPA 出峰时间。

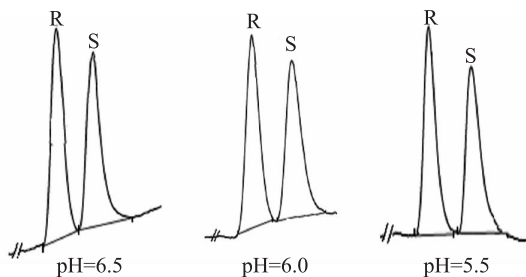


图3 不同 pH 对消旋 N-苯乙酰-BPA 分离图谱的影响
洗脱条件: 甲醇:醋酸缓冲液 = 20:80 (v/v),
流速 0.5mL/min, 检测波长 210nm、温度 20℃。

2.3 Chirobiotic R 手性柱分离消旋的 β -苯丙氨酸

Berthod 等报道^[10], 用手性柱 Chirobiotic T 以甲醇:水 = 40:60 的流动相能将 R-和 S-BPA 完全分开, 分离度为 1.9, 但是我们利用此类柱, 按照此文献提供的方法和检测条件并没有将两种构型的 BPA 分开, 通过改变流动相的组成和比例, 也没有将其完全

分开。后来改用 Chirobiotic R 手性柱,在流动相组成为甲醇:醋酸:三乙胺 = 100:0.4:0.1 (by vol.), 流速 0.4mL/min, 温度 10℃, 检测波长 254nm 的洗脱条件下,两种对映异构体实现了基本分离, R-和 S-型 BPA 的出峰时间分别为 13.5、15.0min, 分离度 1.44 (图 4)。

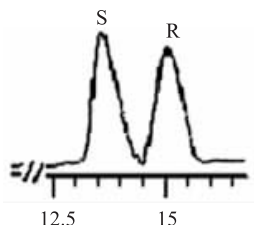


图 4 Chirobiotic R 手性柱分离消旋的 β -苯丙氨酸

3 结论

PGA 在酰化制备光学纯 BPA 的反应过程中,涉及到四种物质 BPA、苯乙酰胺、N-苯乙酰胺-BPA 和苯乙酸,其中 BPA 和 N-苯乙酰胺-BPA 又各有 R-和 S-两种构型。本文建立的 HPLC 方法在 12min 内实现对四种物质的分离检测;12min 和 18min 内实现对 BPA 和 N-苯乙酰胺-BPA 两种异构体的分离检测。在最佳洗脱条件下苯乙酰胺、苯乙酸、N-苯乙酰胺-BPA、BPA 的出峰时间分别为 3.2、5.2、7.6、10.7min; S-和 R-型 N-苯乙酰胺-BPA 的出峰时间分别为 9.4、10.7min。R-和 S-型 BPA 的出峰时间分别为 13.5、15.0min。该法可以对反应过程实时定量监控和对手性物质进行光学纯度分析,从而为相关领域的研究奠定方法基础。

参考文献

[1] Achilles K, Schirmeister T, Otto H H. β -Lactam derivatives as enzyme inhibitors; 1-peptidyl derivatives of 4-phenylazetidin-2-one as inhibitors of elastase and papain [J]. Arch Pharm Pharm

Med Chem, 2000, 333(8): 243-253.

[2] Nagano Y, Ikeda K, Fujishima A, et al. Pyloricidins, novel anti-Helicobacter pylori antibiotics produced by *Bacillus sp* [J]. J Antibiot, 2001, 54(11): 934-947.

[3] Kingston D G I. Taxol, a molecular for all season [J]. Chem Commun., 2001, 20(10): 867-880.

[4] Shewale J G, Deshpande B S, Sudhakaran V K, et al. Penicillin acylase: applications and potentials [J]. Process Biochem, 1992, 27(3): 131-143.

[5] Bruggin K, Roos E C, Devroom E. Penicillin acylase in the industrial production of β -lactam antibiotics [J]. Org Process Res Dev, 1998, 2(2): 128-133.

[6] Khimiuk A Y, Korennykh A V, Van Langen L M, et al. Penicillin acylase - catalyzed peptide synthesis in aqueous medium: a chemoenzymatic route to stereoisomerically pure diketopiperazines [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2003, 14(20): 3123-3128.

[7] Fadnavis N W, Sharfuddin M, Vadivel S K. Resolution of racemic 2-amino-1-butanol with immobilized penicillin G acylase [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 1999, 10(23): 4495-4500.

[8] Chilov G G, Moody H M, Boesten W H J, et al. Resolution of (R, S)-phenylglycinonitrile by penicillin acylase - catalyzed acylation in aqueous medium [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2003, 14(17): 2613-2617.

[9] Li D C, Cheng S W, Wei D Z, et al. Enzymatic production of enantiomerically pure β -phenylalanine by acylation using penicillin G acylase from *Escherichia coli* in aqueous medium [J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(12): 1825-1830.

[10] Berthod A, Liu Y B, Bagwill C, et al. Facile liquid chromatographic enantioresolution of native amino acids and peptides using a teicoplanin chiral stationary phase [J]. J Chromatogr A, 1996, 731(1): 123-137.

(上接第 367 页)

表 2 网络测试结果和期望值的比较

序号	测试值	期望值
1	-0.0033	1.0033
2	-0.0853	1.0853
3	-0.0255	1.0255
4	0.0518	0.9482
5	0.0000	1.0000
6	-0.0080	1.0080
7	0.9926	0.0074
8	0.9921	0.0079
9	1.0045	-0.0080
10	0.9999	0.0001
11	0.9999	0.0001
12	0.9999	0.0001

阵列对蔬菜中不同浓度级别下的 2 种农药残留进行了测试,测试结果经 3 尺度小波包分解来提取特征值,并借用 PCA 和 RBF 神经网络对其进行了鉴别。结果表明利用所提取的特征能够较好地鉴别两种农药残留,且不受浓度级别影响,这说明所给出的农药残留特征信息提取方法是有效的。

参考文献

[1] 蒋雪松,应义斌,王剑平. 生物传感器在农药残留检测中的应用[J]. 农业工程学报, 2005, 21(4): 118-122.

[2] 高俊娥,李盾,刘铭钧. 农药残留快速检测技术的研究进展[J]. 农药, 2007, 46(6): 361-364.

[3] Yin Y, Tian X. Classification of Chinese drinks by a gas sensors array and combination of the PCA and Wilks distribution [J]. Sensors and Actuators B, 2007(124): 393-397.

[4] Jesu's Lozano, Jose' Pedro Santos, Ma Carmen Horillo. Enrichment sampling methods for wine discrimination with gas sensors [J], Journal of Food Composition and Analysis, 2008(21): 716-723.

[5] Yong Yin, Huichun Yu, Hongshun Zhang. A feature extraction method based on wavelet packet analysis for discrimination of Chinese vinegars using a gas sensors array [J]. Sensors and Actuators B, 2008(134): 1005-1009.

[6] 王奉涛,马孝江,张志新,等. 基于小波包分解的频带局部能量特征提取方法[J]. 农业机械学报, 2004, 35(5): 177-180.