

## 反相高效液相色谱法测定酶法生产的 *D* (—)对羟基苯基甘氨酸\*

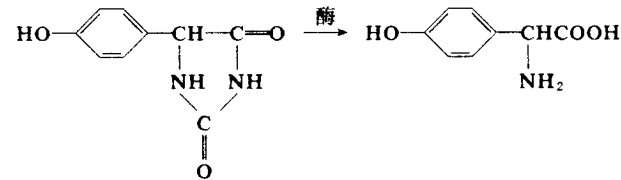
武秀贞 杨坪荣

(山西省生物研究所,太原,030006)

*D* (—)对羟基苯基甘氨酸为人工合成氨基酸,它是半合成青霉素和头孢菌素的重要原料,用假单胞菌(*pseudomonas*)SP2262的胞内酶,将 *DL*-5-对羟基苯基乙内酰脲经一次拆分、消解,转化为 *D* (—)对羟基苯基甘氨酸。反应只需 20h,收率 95%,产品含量在 95%以上。应用反相高压液相色谱法(紫外检测),可测定反应底物和产品。该色谱系统测定 *D* (—)对羟基苯基甘氨酸的灵敏度  $2806.36 \text{ mV} \cdot \text{ml} \cdot \text{mg}^{-1}$ ,检测限  $1.6 \times 10^{-8} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

### 实验部分

(一)仪器与试剂 日立 635 高压液相色谱仪,日立 200-10 型紫外可见波长检测器,岛津 C-R3A 色



*DL*-5-对羟基苯基乙内酰脲

*D* (—)对羟基苯基甘氨酸

(二)以 *D* (—)对羟基苯基甘氨酸的进样量( $\mu\text{g}$ )对峰面积( $\text{mV} \cdot \text{sec}$ )作图,线性关系良好,相关系数  $\gamma = 0.998$ ,回归方程  $Y = -258048 + 224870X$ 。

(三)本试验选用固定相为 YWG-C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>,流动相为 0.05mol/L CH<sub>3</sub>COONa 反相色谱系统获得了理想色谱图(图 1、2),该色谱系统  $t_0 = 2.67\text{min}$ ,保留时间:*D* (—)对羟基苯基甘氨酸 3.15min,*DL*-5-对羟基苯基乙内酰脲 10.59min,分离系数  $\alpha = 16.47$ 。

(四)向酶反应产物中定量添加标准 *D* (—)对羟基苯基甘氨酸后测定回收率,*D* (—)对羟基苯基甘氨酸的回收率在 96.5%—102.3%之间。

谱数据处理装置,六通进样器。醋酸、醋酸钠均为 AR 级。

(二)色谱条件 色谱柱  $\phi 5\text{mm} \times 200\text{mm}$  不锈钢柱,装填 YWG-C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>,  $10\mu\text{m}$ ;流动相 0.05mol/L CH<sub>3</sub>COONa,(CH<sub>3</sub>COOH 调 pH 至 2.5),流速,  $1\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ;检测 UV254nm;量程 0.128AUFS;柱温 35°C;压力  $419 \times 10^6 \text{ Pa}$ 。

(三)样品预处理 假单胞菌经放大培养、酶反应、分离、提取得色谱分析用样品。

### 结果与讨论

(一)酶反应的化学反应式见下:

### 参考文献

- [1] 齐长兴等,中国抗生素杂志,14(5),357(1989).
  - [2] 方肇伦主编,《仪器分析在土壤学和生物学中的应用》,科学出版社,北京,P. 252,1983.
- (收稿日期:1991年5月18日,修回日期:12月29日)

**A Study on Analysis of *D* (—) *p*-Hydroxyphenyl Glycine Produced with Enzyme by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)** Wu Xiuzhen and Yang Pingrong, Shanxi Institute of Biology, Taiyuan, 030006

This paper presents the analytical method of *D* (—) *p*-hydroxyphenyl glycine produced with

\* 酶法生产 *D* (—)对羟基苯基甘氨酸为国家自然科学基金资助项目

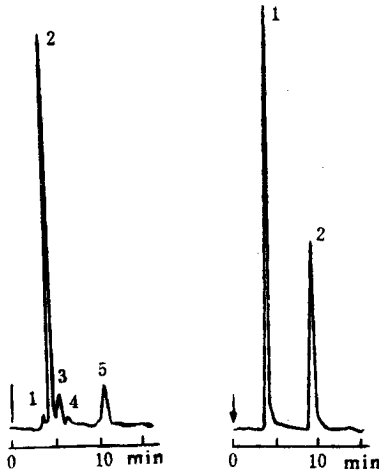


图1(左) 酶反应产物色谱图

峰: 1, 3, 4. 未知物, 2. *D*(-)-对羟基苯甘氨酸, 5. *DL*-5-对羟基苯乙内酰胺。

图2(右) 标样色谱图

*D*(-)-对羟基苯甘氨酸, 2. *DL*-5-对羟基苯乙内酰胺

enzyme. The products from the enzyme reaction were analyzed by HPLC with the recoveries of 95% and the errors of 5%. It is shown that this method is sensitive, fast and reliable.

## 高效液相色谱用于鹿茸中多肽的分离制备

周海欧 张志强 尤耕野 刘诗月

(吉林省中医中药研究院, 长春, 130021)

研究证明, 鹿茸中含有多肽。孙晓波等曾报道鹿茸总多肽具有明显的抗炎作用<sup>[1]</sup>。我们根据多肽的特性, 利用高效液相色谱法(HPLC)从鹿茸中制备多肽。用HPLC进行分离纯化, 得到两种纯多肽(P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>)。纯化后的P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>经PTH法鉴定只有一种末端氨基酸, 药理实验证明, P<sub>1</sub>肽具有抗炎活性, P<sub>2</sub>肽无活性。P<sub>1</sub>肽的抗炎活性表现在对右旋糖酐性足肿胀和角叉菜胶性足肿胀均有明显抑制作用<sup>[2]</sup>。本法分离制备多肽具有快速、简单、纯度和回收率高(90%以上)等优点, 为动植物小分子肽的分离纯化提供了简便方法。

### (一) 仪器与试剂

1. 仪器 美国 Beckman 344-M 高效液相色谱恒溶剂泵 114M 制备系统, 紫外可见双通道检测器,

427 积分仪。

2. 试剂 实验用试剂为色谱纯。

### (二) 色谱条件

色谱柱: UltraspHERE R, 5 $\mu$ m, Sphenical 80A pore C<sub>18</sub>, 10.0mm i.d.  $\times$  250mm; 流动相: 甲醇-水(15:85); 流速: 15ml/min; 检测波长:  $\lambda$  = 254nm; 进样量: 100 $\mu$ l(1-2mg)。

### (三) 鹿茸中多肽的提取

将鹿茸用沸水提取 6h, 浓缩后用乙醇(终浓度达 66%)沉淀, 除去蛋白质和多糖, 重复沉淀一次, 将上清液中的乙醇除去, 上 Sephadex G-50 柱, 收集有效部位(注: 用蒸馏水洗脱), 将有效部位用 Sephadex G-10 脱盐, 冷冻干燥, 即得所提物多肽, 进行 HPLC 分离制备。

### (四) 制备分离

采用上述色谱条件, 用控制保留时间截取不同的流分, 得到较满意的效果。从制备分离结果看, 用反相 HPLC 进行制备, 15 分钟可完成一次分离制备分析, 所得纯肽经 PTH 双相薄层色谱分析鉴定, 结果显单一斑点。重复 HPLC 分析为单一峰, 证明只有一种末端氨基酸, 说明所得的肽为纯多肽。所得两个肽经药理实验证明, P<sub>1</sub> 肽有活性, P<sub>2</sub> 肽无活性。

### 参考文献

- [1] 孙晓波等, 中药药理通报, 4(4), 20(1987).
  - [2] 徐叔云, 《药理实验方法学》, 人民卫生出版社, 北京, P. 524, 1982.
  - [3] E. B. Uliveiva et al., J. Biol. Chem., 254, 489(1979).
- (收稿日期: 1991年5月8日, 修回日期: 92年3月16日)

**Separation and Preparation of Multi-Peptide in Pilose by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography.** Zhou Haiou, Zhang Zhiqiang, You Gengye, Liu Shiyue, Institute of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica of Jilin Province, Changchun, 130021

The sample was separated with Sephadex G-50 column to collect the active ingredients which in turn were desalted with G-10 column. The multi-peptide thus obtained was purified by preparative reversed-phase high performance liquid chromatography. The optimal conditions: Column: 250  $\times$  10mm i. d. with 5 $\mu$ m UltraspHERE 80A-C<sub>18</sub>; mobile phase: Methanol: Water = 15:85; flow rate 15ml/min; Detector wavelength: 254nm, sample size: 100 $\mu$ l(1-2mg).