

Application News

No. C156

Liquid Chromatography Mass Spectrometry

使用柱切换系统进行发酵饮料中的手性氨基酸分析

构成蛋白质的 20 种的氨基酸除甘氨酸外，其余均存在 D/L 的光学异构体。相较于 L- 氨基酸，D- 氨基酸的含量显得极低，但近年来，已探明蔬菜和水果等多种食物中均含有 D- 氨基酸。已知发酵食品中存在多种 D- 氨基酸。

食物中含有的 D- 氨基酸具有多种效果。且已知 D- 丙氨酸和 D- 亮氨酸、D- 苯丙氨酸相较于各自的 L- 氨基酸均具有较强的甜味。D- 氨基酸的含量会影响发酵食品的味道，因此，发酵食品中的 D- 氨基酸的高灵敏度、高选择性的分析法备受瞩目。

本应用新闻将介绍采用由高压流量切换阀 (FCV) 组成的 2 种手性柱交替使用的柱切换系统 (应用新闻 C149) 进行发酵饮料的分析例。

Y. Uno, T.Hattori

■ 样本的前处理

我们使用了 3 种黑醋饮料和 2 种酸奶饮料。针对各样品，均用水、甲醇、氯仿的液液萃取的前处理 [1]。前处理方案如图 1 所示。

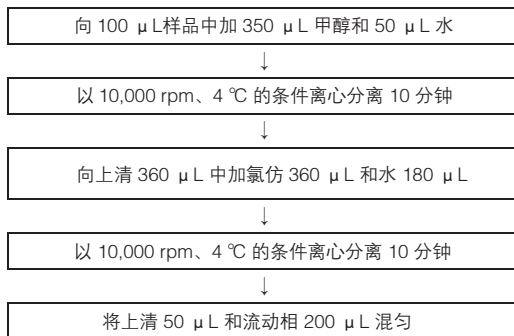


图 1 前处理方案

表 1 测量条件

Column	: CROWNPAK CR-(+)/CR-(-) (3 mm × 150 mm, 5 µm)
Mobile phase	: acetonitrile/ethanol/water/TFA = 80/15/5/0.5
Flow rate	: 0.6 mL/min.
Injection volume	: 1 µL
Injection volume	: 20 °C
Ionization mode	: ESI (Positive)
Probe voltage	: +4.0 kV
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min.
Drying gas flow	: 15.0 L/min.
Heating gas flow	: 5.0 L/min.
Interface temperature	: 250 °C
DL temperature	: 250 °C
Block heater temperature	: 300 °C

■ 黑醋饮料的分析结果

确认了 3 种黑醋饮料中均含有 D- 氨基酸 (表 2)。在确认 D/L 比时，探明了黑醋饮料 B 和黑醋饮料 C 中含有较多的 D-Ala。

表 2 黑醋饮料中含有氨基酸的 D/L 比

	黑醋饮料 A		黑醋饮料 B		黑醋饮料 C	
	Area	ratio of D/L	Area	ratio of D/L	Area	ratio of D/L
D-Ala	7127	3.8 %	54094	20.5 %	26505	15.5 %
L-Ala	187083		263547		171483	
D-Arg	23703	0.6 %	81626	2.4 %	106896	1.7 %
L-Arg	3945110		3353883		6214029	
D-Asn	7047	1.3 %	11213	3.4 %	13135	3.0 %
L-Asn	547867		333152		433012	
D-Asp	6934	1.5 %	7086	2.3 %	8248	2.2 %
L-Asp	476730		302901		370152	
D-Cys	(N.D.)	-	(N.D.)	-	(N.D.)	-
L-Cys	(N.D.)		(N.D.)			
D-Gln	4153	56.1 %	5013	128.1 %	5738	17.3 %
L-Gln	7399		3912		33155	
D-Glu	11658	0.7 %	36502	2.2 %	7575	1.1 %
L-Glu	1635202		1675657		713130	
Gly	2375	-	6382	-	3163	-
D-His	(N.D.)		(N.D.)		(N.D.)	
L-His	351973	-	410895	-	232228	-
D-Ile	1262		(N.D.)		1861	
L-Ile	392041	0.3 %	580580	-	330869	0.6 %
D-allo-Ile	1816		(N.D.)		2519	
L-allo-Ile	3612	50.3 %	4357	-	1840	136.9 %
D-Leu	3255		4698		4198	
L-Leu	691108	0.5 %	1031536	0.5 %	493487	0.9 %
D-Lys	13921		4446		28009	
L-Lys	965688	1.4 %	1220610	0.4 %	548517	5.1 %
D-Met	(N.D.)		(N.D.)		(N.D.)	
L-Met	22647	-	48753	-	13151	-
D-Phe	2738		3587		3634	
L-Phe	746758	0.4 %	549410	0.7 %	419561	0.9 %
DL-Pro	301069		683984		549718	
D-Ser	10568	9.3 %	8036	7.5 %	4653	8.5 %
L-Ser	113543		106729		54472	
D-Thr	2646	1.7 %	4374	2.3 %	2036	1.2 %
L-Thr	159723		193429		170581	
D-allo-Thr	1973	91.6 %	3538	120.7 %	1297	66.6 %
L-allo-Thr	2153		2932		1946	
D-Trp	2098	23.2 %	2195	39.1 %	4159	39.6 %
L-Trp	9045		5609		10506	
D-Tyr	7314	1.7 %	2495	0.8 %	4026	1.4 %
L-Tyr	437963		314522		297401	
D-Val	3046	0.5 %	3186	0.4 %	3613	0.9 %
L-Val	573054		870777		387972	

■ 酸奶饮料的分析结果

确认了2种酸奶饮料中均含有D-氨基酸(表3)。在确认D/L比时,探明了相对而言含量较大的D-氨基酸为Ala、Arg、Asn、Asp、Glu、Lys、Ser。尤其是D-Glu,两种酸奶饮料中的D-Glu含量均超过了L-Glu的40倍。

表3 酸奶饮料中含有氨基酸的D/L比

	酸奶 D		酸奶 E	
	Area	ratio of D/L	Area	ratio of D/L
D-Ala	140959	164.0 %	37900	40.2 %
L-Ala	85940		94190	
D-Arg	81779	6.9 %	95602	36.5 %
L-Arg	1192614		262060	
D-Asn	60836	43.2 %	3209	16.5 %
L-Asn	140872		19416	
D-Asp	47149	38.1 %	2441	15.3 %
L-Asp	123860		16003	
D-Cys	(N.D.)	-	(N.D.)	-
L-Cys	(N.D.)		(N.D.)	
D-Gln	4743	0.6 %	5157	19.8 %
L-Gln	856603		26021	
D-Glu	412572	4091.1 %	163715	5069.6 %
L-Glu	10085		3229	
Gly	957	-	1106	-
D-His	(N.D.)		(N.D.)	
L-His	839834	-	175326	5.2 %
D-Ile	1428		0.8 %	
L-Ile	176626	130832		
D-allo-Ile	2225	59.4 %	1247	39.3 %
L-allo-Ile	3744		3172	
D-Leu	4042	1.0 %	(N.D.)	-
L-Leu	403567		132923	
D-Lys	1151264	73.5 %	24797	3.5 %
L-Lys	1565451		698677	
D-Met	463	0.9 %	(N.D.)	-
L-Met	54490		(N.D.)	
D-Phe	1600	0.5 %	1799	1.5 %
L-Phe	313615		117732	
DL-Pro	2094819	14.4 %	888155	29.3 %
D-Ser	14619		8332	
L-Ser	101651	28395		
D-Thr	1711	1.5 %	3314	4.6 %
L-Thr	112074		71653	
D-allo-Thr	1973	42.5 %	1020	23.7 %
L-allo-Thr	4647		4294	
D-Trp	3039	1.9 %	1879	13.3 %
L-Trp	155899		14086	
D-Tyr	4882	2.1 %	5876	107.4 %
L-Tyr	230926		5470	
D-Val	1241	0.4 %	1277	0.9 %
L-Val	285792		148323	

参考文献

[1] Nakano, Y., Konya, Y., Taniguchi, M., Fukusaki, E., Journal of Bioscience and Bioengineering, 123, 134-138 (2016)

■ 发酵饮料的D/L氨基酸含量的比较

在黑醋饮料和酸奶饮料中, D对映体含量较大的氨基酸的含量进行了比较(图2)。结果显示, 相较于黑醋饮料, 酸奶饮料中含有更多种类的D-氨基酸。

虽然黑醋饮料和酸奶饮料两者均有检测出D-Ala和D-Ser, 但酸奶饮料的D-Ala含量更大。

且探明了相较于黑醋饮料, 酸奶饮料中L-Glu的含量非常小。此外, 酸奶饮料中D-Glu含量与黑醋饮料的L-Glu含量相比也显得更多。

相对而言, 酸奶D中含有的各种D-氨基酸的量较大。尤其是D-Ala和D-Lys, 含量比黑醋饮料更大。

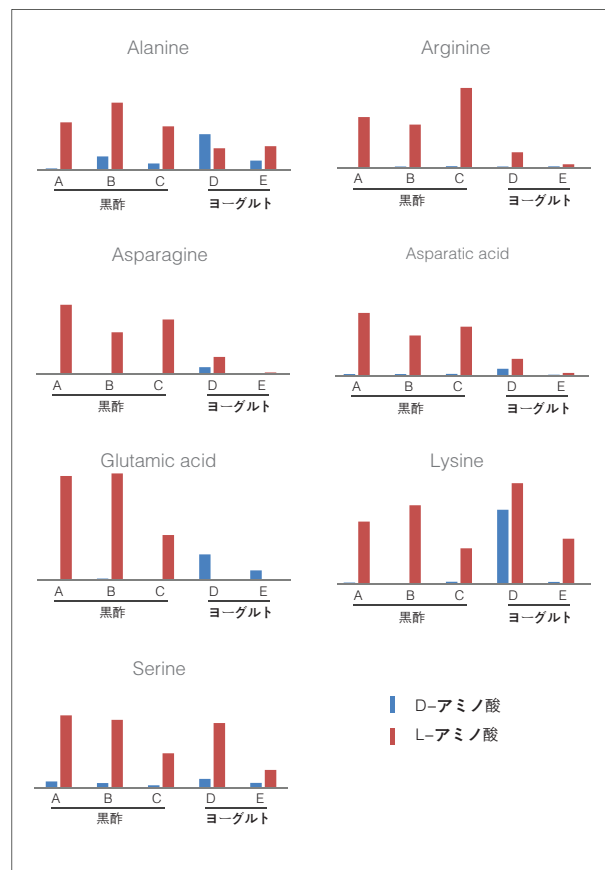


图2 黑醋饮料和酸奶饮料的D/L氨基酸的比较

以上分析结果表明使用柱切换系统的手性氨基酸分析方法能有效用于实际样品的分析。



岛津企业管理(中国)有限公司
岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

*本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
*本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2017年4月