

利用高效液相色谱荧光检测法自动分析三十七种 D/L- 氨基酸及其在酒类样品中的应用

N Iwata

特点描述

- ◆ 该仪器操作简单，可在短时间内分离和测定 37 种 D/L- 氨基酸。
- ◆ 自动化操作减少了劳动力，每连续分析 20 个样品可节省一个多小时的工作时间。
- ◆ 衍生反应的时间保持不变，因此测定结果具有良好的重现性。

■ 引言

氨基酸除甘氨酸外分子结构中都具有不对称中心，可分为 D/L 对映体。与 L- 氨基酸相比，对 D- 氨基酸的研究十分有限。直到最近，人们对 D- 氨基酸在食物和食品的适口性、防腐性和香味方面的作用还知之甚少。不过，已知发酵食品和生物样本中除了含有大量的 L- 氨基酸外，还含有少量的 D- 氨基酸。因此，对氨基酸 D/L 分离分析的需求不断增加。

本文介绍了利用具有手性结构的衍生试剂分析蛋白源 D/L- 氨基酸的荧光非对映异构体。此外，它还介绍了包括衍生化在内的自动化分析。

■ 手性胺的衍生化

采用两种手性硫醇，n- 乙酰 -l- 半胱氨酸 (NAC) 和 n- 异丁酰 -l- 半胱氨酸 (NIBC) 进行衍生化。在 NAC 或 NIBC 条件下，通过与邻苯二甲醛 (OPA) 反应，对 D/L- 氨基酸的非对映异构体进行荧光衍生。

■ D/L- 氨基酸的液相色谱分析

一般来说，HPLC 对 D/L- 氨基酸的分析采用 LC/MS 或多维 LC，因为在单一分离模式下很难分离蛋白质生成的 D/L- 氨基酸。然而，众所周知，LC/MS 易受基质效应的影响，定量性不如 HPLC。而多维液相色谱法则需要较长的分析时间和非常复杂的 HPLC 设置。因此，需要一种能在短时间内实现 D/L- 氨基酸良好分离且操作简单的方法。

在食品分析中，使用小粒径色谱柱可以从大量的 L- 氨基酸和并存的污染物中适当分离出少量的 D- 氨基酸。由于系统压力变得很高，因此使用了耐压 130 MPa 的 Nexera X3。

■ 分析条件和自动分析

目标化合物是 37 种 D/L- 氨基酸，其中不包括 D/L- 脯氨酸 (表 1)。红色和蓝色背景色分别表示 OPA/NAC 和 OPA/NIBC 衍生氨基酸。

图 1 显示了用于自动分析的 HPLC 设置流程图。在本研究中，使用溶剂输送泵的流动相混合功能自动制备流动相，并自动切换两套分析条件。使用自动进样器的自动预处理功能对 D/L- 氨基酸进行衍生处理。表 2 所示的两套分析条件的不同之处在于有机溶剂的混合比例和梯度曲线。流动相混合功能只需将有机溶剂和超纯水设置在泵内集成的低压梯度套件的端口中，即可按照指定的混合比例提供溶液。该功能减少了流动相制备和流动相更换以及分析条件切换所需的人力和工作时间。

此外，自动预处理功能如下所述。将 OPA/NAC 和 OPA/NIBC 衍生试剂以及目标样品置于自动进样器中。衍生过程在进样针内完成，衍生后的非对映异构体被导入色谱柱，不会与外界发生任何接触 (表 3 和表 4)。图 2 显示了 LabSolutions™ 工作站上预处理程序的设置界面。利用预处理功能，从开始衍生到进样再到高效液相色谱法的时间保持不变，因此测定结果具有良好的重现性。此外，由于不需要用于衍生的小瓶，消耗品成本也有所降低。

表 5 显示了分析 20 个样品时自动化操作和手动操作所需工作时间的比较。与人工操作相比，自动化操作减少了人认为操作及一个多小时的工作时间。

表 1 目标化合物清单

1	D-Asp	8	D-Arg	15	D-Ile	22	L-Ser	29	L-Tyr	36	L-Leu
2	D-Glu	9	D-Ala	16	D-Phe	23	L-Gln	30	L-Val	37	L-Lys
3	D-Asn	10	D-Tyr	17	D-Leu	24	L-His	31	L-Met		
4	D-Ser	11	D-Val	18	D-Lys	25	L-Thr	32	L-(Cys) ₂		
5	D-Gln	12	D-Met	19	L-Asp	26	Gly	33	L-Trp		
6	D-His	13	D-(Cys) ₂	20	L-Glu	27	L-Arg	34	L-Ile		
7	D-Thr	14	D-Trp	21	L-Asn	28	L-Ala	35	L-Phe		

* 背景颜色；红色：OPA/NAC 衍生氨基酸，蓝色：OPA/NIBC 衍生氨基酸

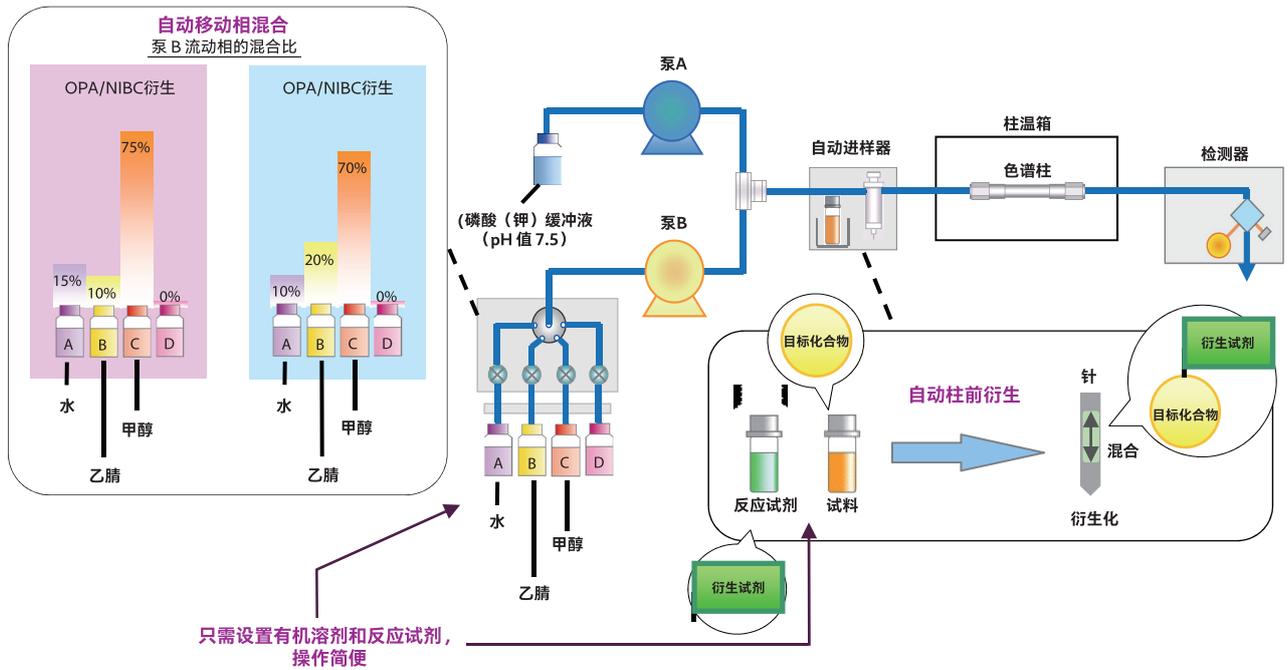


图1 自动分析HPLC设置流程图

表 2 分析条件

系统	Nexera X3																																
色谱柱	<table border="0"> <tr> <td><OPA/NAC 衍生></td> <td><OPA/NIBC 衍生></td> </tr> <tr> <td>Shim-pack Scepter™ 1.9 μm C8¹ (150 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm)</td> <td>Shim-pack Scepter 1.9 μm C8 (150 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm)</td> </tr> <tr> <td>流速 : 0.6 mL/min</td> <td>0.6 mL/min</td> </tr> <tr> <td>流动相 : <泵 A></td> <td><泵 A></td> </tr> <tr> <td>10 mmol/L (钾) 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) *</td> <td>10 mmol/L (钾) 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5)</td> </tr> <tr> <td><泵 B></td> <td><泵 B></td> </tr> <tr> <td>流动相混合</td> <td>流动相混合</td> </tr> <tr> <td>A) 水</td> <td>A) 水</td> </tr> <tr> <td>B) 乙腈</td> <td>B) 乙腈</td> </tr> <tr> <td>C) 甲醇</td> <td>C) 甲醇</td> </tr> <tr> <td>A/B/C=15:10:75</td> <td>A/B/C=10:20:70</td> </tr> <tr> <td>时间程序 : 4%B (0-3 min)→11%B (13 min)→14%B (22 min)→25%B (30 min)→30%B (35 min)→41%B (61 min)→80%B (61.01-63 min)→4%B (63.01-67 min)</td> <td>10%B (0 min)→15%B (3-15 min)→20%B (25 min)→52%B (57 min)→80%B (57.01-59 min)→10%B (59.01-63 min)</td> </tr> <tr> <td>柱温 : 35°C</td> <td>35°C</td> </tr> <tr> <td>进样量 : 1 μL</td> <td>1 μL</td> </tr> <tr> <td>小瓶 : 岛津 LabTotal™, LC 1.5 mL, 玻璃²</td> <td>岛津 LabTotal™, LC 1.5 mL, 玻璃</td> </tr> <tr> <td>检测 (FL) : Ex: 350 nm, Em: 450 nm (RF-20AXS)</td> <td>Ex: 350 nm, Em: 450 nm (RF-20AXS)</td> </tr> </table>	<OPA/NAC 衍生>	<OPA/NIBC 衍生>	Shim-pack Scepter™ 1.9 μm C8 ¹ (150 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm)	Shim-pack Scepter 1.9 μm C8 (150 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm)	流速 : 0.6 mL/min	0.6 mL/min	流动相 : <泵 A>	<泵 A>	10 mmol/L (钾) 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) *	10 mmol/L (钾) 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5)	<泵 B>	<泵 B>	流动相混合	流动相混合	A) 水	A) 水	B) 乙腈	B) 乙腈	C) 甲醇	C) 甲醇	A/B/C=15:10:75	A/B/C=10:20:70	时间程序 : 4%B (0-3 min)→11%B (13 min)→14%B (22 min)→25%B (30 min)→30%B (35 min)→41%B (61 min)→80%B (61.01-63 min)→4%B (63.01-67 min)	10%B (0 min)→15%B (3-15 min)→20%B (25 min)→52%B (57 min)→80%B (57.01-59 min)→10%B (59.01-63 min)	柱温 : 35°C	35°C	进样量 : 1 μL	1 μL	小瓶 : 岛津 LabTotal™, LC 1.5 mL, 玻璃 ²	岛津 LabTotal™, LC 1.5 mL, 玻璃	检测 (FL) : Ex: 350 nm, Em: 450 nm (RF-20AXS)	Ex: 350 nm, Em: 450 nm (RF-20AXS)
<OPA/NAC 衍生>	<OPA/NIBC 衍生>																																
Shim-pack Scepter™ 1.9 μm C8 ¹ (150 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm)	Shim-pack Scepter 1.9 μm C8 (150 mm x 3.0 mm I.D., 1.9 μm)																																
流速 : 0.6 mL/min	0.6 mL/min																																
流动相 : <泵 A>	<泵 A>																																
10 mmol/L (钾) 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) *	10 mmol/L (钾) 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5)																																
<泵 B>	<泵 B>																																
流动相混合	流动相混合																																
A) 水	A) 水																																
B) 乙腈	B) 乙腈																																
C) 甲醇	C) 甲醇																																
A/B/C=15:10:75	A/B/C=10:20:70																																
时间程序 : 4%B (0-3 min)→11%B (13 min)→14%B (22 min)→25%B (30 min)→30%B (35 min)→41%B (61 min)→80%B (61.01-63 min)→4%B (63.01-67 min)	10%B (0 min)→15%B (3-15 min)→20%B (25 min)→52%B (57 min)→80%B (57.01-59 min)→10%B (59.01-63 min)																																
柱温 : 35°C	35°C																																
进样量 : 1 μL	1 μL																																
小瓶 : 岛津 LabTotal™, LC 1.5 mL, 玻璃 ²	岛津 LabTotal™, LC 1.5 mL, 玻璃																																
检测 (FL) : Ex: 350 nm, Em: 450 nm (RF-20AXS)	Ex: 350 nm, Em: 450 nm (RF-20AXS)																																

*1 P/N: 227-31034-04, * 2 P/N: 227-34001-01

※ 在 2000 mL 超纯水中加入 0.68 g 磷酸二氢钾和 2.61 g 磷酸氢二钾，完全溶解。

表 3 利用自动进样器进行自动柱前衍生化的概述

<OPA/NAC 衍生化>	<OPA/NIBC 衍生>
① 抽取 4μL OPA/NAC 溶液	① 抽取 4μL OPA/NIBC 溶液
② 抽取样品 1μL	② 抽取样品 1μL
③ 混合	③ 混合
④ 注入 HPLC	④ 注入 HPLC

表 4 衍生试剂的制备

OPA 试剂	将 0.3 mL 乙醇加入 10 mg 邻苯二醛中并完全溶解。然后加入 0.7 mL 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液和 4 mL 超纯水。
0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液	在 100 mL 超纯水中加入 0.62 g 硼酸和 0.20 g 氢氧化钠，并完全溶解。
NAC 溶液	将 20 mg n- 乙酰-L- 半胱氨酸添加到 10 mL 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液中。
NIBC 溶液	将 20 mg n- 异丁酰-L- 半胱氨酸添加到 10 mL 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液中。
OPA/NAC 溶液	混合等体积的 OPA 试剂和 NAC 溶液。
OPA/NIBC 溶液	混合等体积的 OPA 试剂和 NIBC 溶液。

表5 分析20个样品时自动化操作与手动操作工作时间的比较

		自动	手册
流动相制备	缓冲液		5分钟
	有机溶剂	○ 0分钟 ※移动相位混合功能	× 10分钟
更换流动相的同时切换分析条件		○ 0分钟 ※移动相位混合功能	× 10分钟
衍生试剂制备			10分钟
衍生化		○ 0分钟 ※自动柱前衍生化	× 50分钟
总计		○ 15分钟	× 85分钟

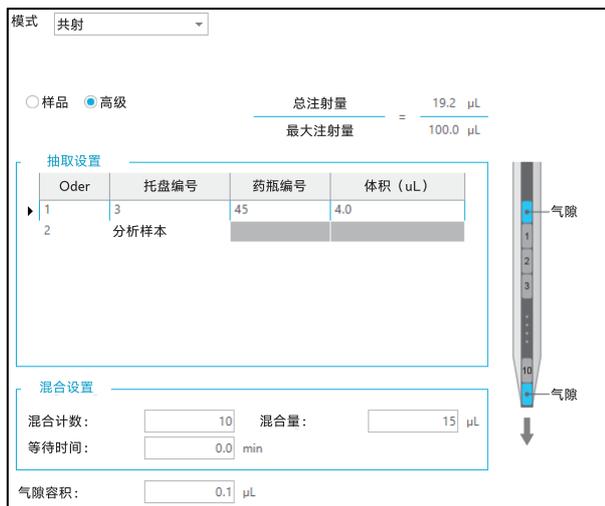


图 2 预处理程序的设置屏幕

■ D/L- 氨基酸标准溶液的分析

图 3 显示了 D/L- 氨基酸标准溶液（每种 5 μmol/L）的色谱图。使用两种手性硫醇，在大约 120 分钟内对 37 种 D/L- 氨基酸进行了互补分离。

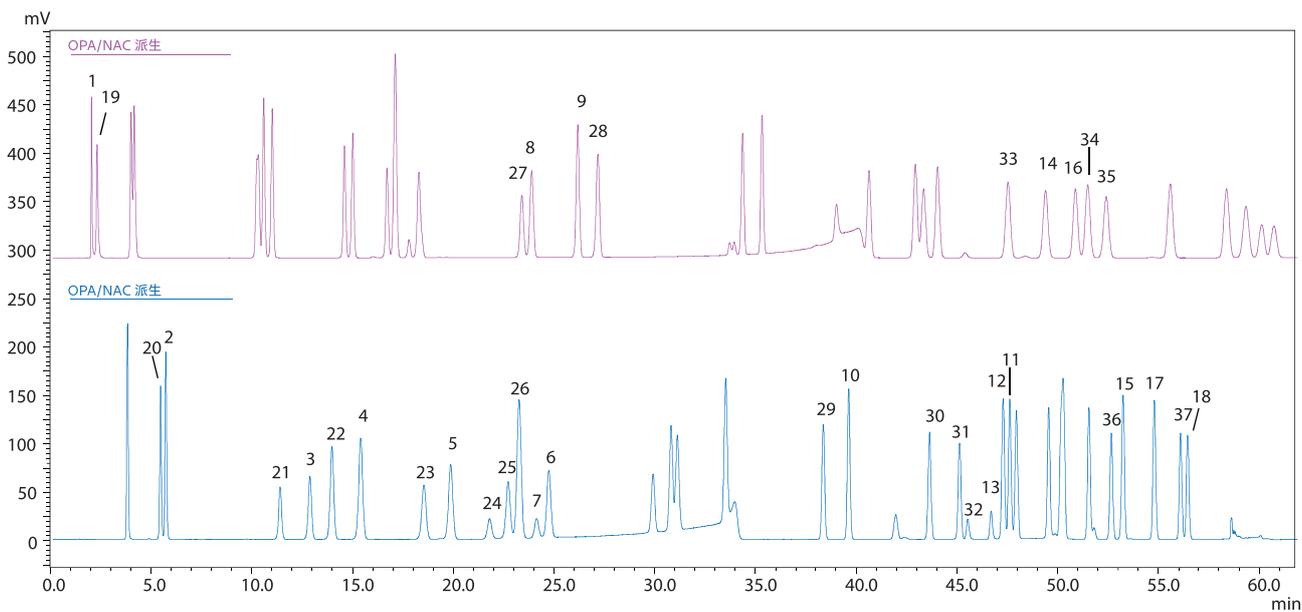


图 3 D/L- 氨基酸标准溶液的色谱图（各 5 μmol/L）

■ 重现性

根据对 D/L- 氨基酸标准溶液（每种 2 μmol/L）的六次重复分析,保留时间和峰面积的相对标准偏差 (%RSD) 分别为 0.1% 或以下和 1.5% 或以下（表 6）。

■ 标准曲线

37 种 D/L- 氨基酸的校准曲线线性良好。各相关系数 r^2 均大于或等于 0.999（图 4 和表 7）。

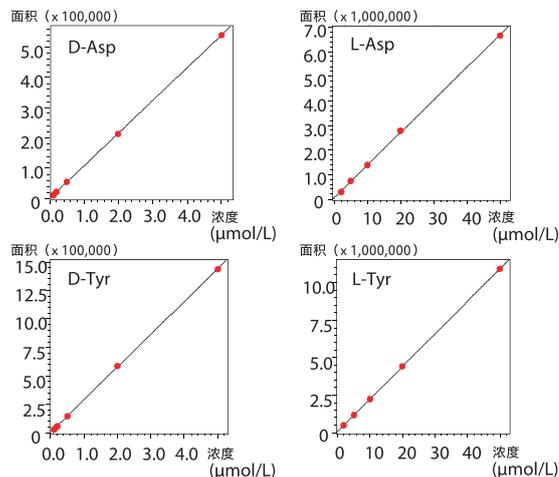


图 4 标准曲线

表 6. 重现性 (RSD%, n = 6)

化合物	保留时间	峰面积	化合物	保留时间	峰面积	化合物	保留时间	峰面积
1 D-Asp	0.23	1.50	14 D-Trp	0.05	0.42	27 L-Arg	0.02	0.18
2 D-Glu	0.09	0.47	15 D-Ile	0.02	0.38	28 L-Ala	0.03	0.54
3 D-Asn	0.09	0.29	16 D-Phe	0.06	0.51	29 L-Tyr	0.02	0.28
4 D-Ser	0.10	0.19	17 D-Leu	0.02	0.30	30 L-Val	0.01	0.37
5 D-Gln	0.09	0.26	18 D-Lys	0.02	0.50	31 L-Met	0.01	0.35
6 D-His	0.07	0.40	19 L-Asp	0.35	1.32	32 L-(Cys) ₂	0.02	0.62
7 D-Thr	0.06	0.25	20 L-Glu	0.09	0.44	33 L-Trp	0.05	0.44
8 D-Arg	0.02	0.19	21 L-Asn	0.09	0.26	34 L-Ile	0.06	0.72
9 D-Ala	0.03	0.49	22 L-Ser	0.10	0.19	35 L-Phe	0.06	0.52
10 D-Tyr	0.01	0.28	23 L-Gln	0.10	0.29	36 L-Leu	0.02	0.31
11 D-Val	0.02	0.62	24 L-His	0.06	0.40	37 L-Lys	0.02	0.43
12 D-Met	0.02	0.35	25 L-Thr	0.07	0.35			
13 D-(Cys) ₂	0.02	0.38	26 Gly	0.07	0.41			

* 背景颜色; 红色: OPA/NAC 衍生氨基酸, 蓝色: OPA/NIBC 衍生氨基酸

表 7 校准曲线的浓度范围和相关系数 (r^2)

化合物	浓度范围 ($\mu\text{mol/L}$)	r^2	化合物	浓度范围 ($\mu\text{mol/L}$)	r^2
1 D-Asp	0.1-5	0.99997	19 L-Asp	2-50	0.99968
2 D-Glu	0.1-5	0.99986	20 L-Glu	2-50	0.99999
3 D-Asn	0.1-5	0.99992	21 L-Asn	2-50	0.99999
4 D-Ser	0.1-5	0.99997	22 L-Ser	0.5-20	0.99996
5 D-Gln	0.1-5	0.99997	23 L-Gln	0.5-20	0.99995
6 D-His	0.2-50	0.99995	24 L-His	0.2-100	0.99991
7 D-Thr	0.1-5	1.00000	25 L-Thr	0.1-10	0.99957
8 D-Arg	0.1-20	0.99994	26 Gly	0.5-100	0.99996
9 D-Ala	0.1-5	0.99997	27 L-Arg	2-100	0.99993
10 D-Tyr	0.1-5	0.99993	28 L-Ala	5-100	0.99951
11 D-Val	0.1-2	1.00000	29 L-Tyr	2-50	0.99998
12 D-Met	0.1-5	0.99999	30 L-Val	2-50	0.99998
13 D-(Cys) ₂	0.1-5	0.99993	31 L-Met	0.1-5	0.99999
14 D-Trp	0.1-5	0.99996	32 L-(Cys) ₂	2-50	0.99995
15 D-Ile	0.1-5	0.99990	33 L-Trp	2-50	0.99994
16 D-Phe	0.1-5	0.99997	34 L-Ile	0.5-20	0.99987
17 D-Leu	0.1-5	0.99996	35 L-Phe	2-50	0.99991
18 D-Lys	0.1-5	0.99996	36 L-Leu	2-50	0.99999
			37 L-Lys	0.5-20	0.99993

* 背景颜色; 红色: OPA/NAC 衍生氨基酸, 蓝色: OPA/NIBC 衍生氨基酸

■ 应用于分析酒类样品

样品包括两种啤酒 (啤酒 A 和啤酒 B)、清酒、红葡萄酒和白葡萄酒。啤酒 A 和清酒用 10 mmol/L 盐酸稀释五倍, 然后通过 0.2 μm 滤膜过滤器。啤酒 B、红葡萄酒和白葡萄酒用 10 mmol/L 盐酸稀释 10 倍, 然后通过 0.2 μm 滤膜过滤器。

本研究使用的五种白酒样品中均含有 D- 天门冬氨酸、D- 谷氨酸、D- 丝氨酸、D- 组氨酸、D- 丙氨酸和 D- 亮氨酸。

在红葡萄酒和白葡萄酒中发现了 D- 谷氨酰胺和 D- 色氨酸。在两种啤酒中发现了 D- 苯丙氨酸 (图 5 和图 6)。啤酒 A 中 D- 氨基酸的含量约为啤酒 B 的 2 倍; 啤酒 B 中 D- 氨基酸与 D/L- 氨基酸的比例约为啤酒 A 的 2 倍; 此外, 还发现 D- 异构体的含量与 L- 异构体的含量相比非常少 (图 7 和图 8)。

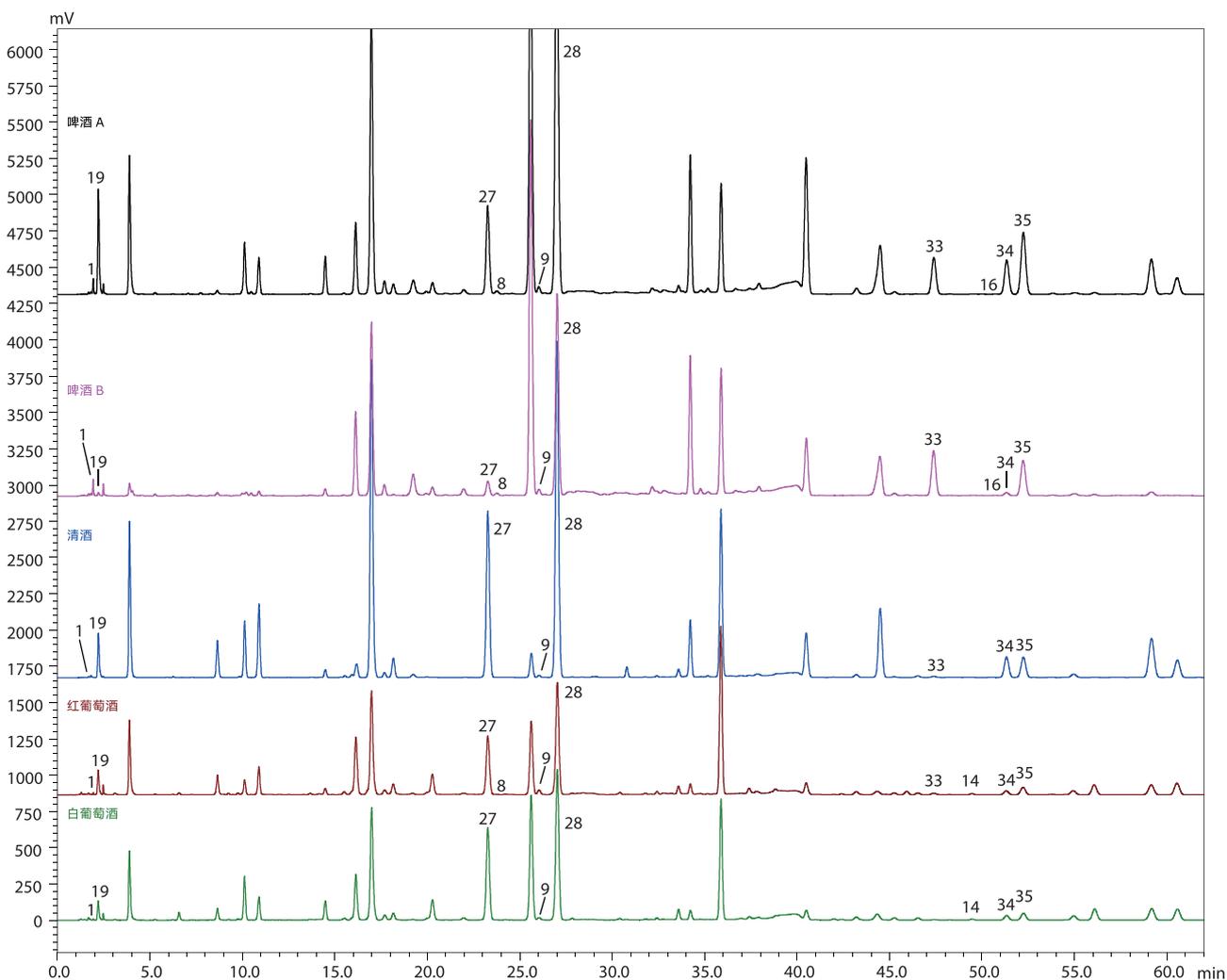


图 5 酒类样品的色谱图 (OPA/NAC 衍生法)

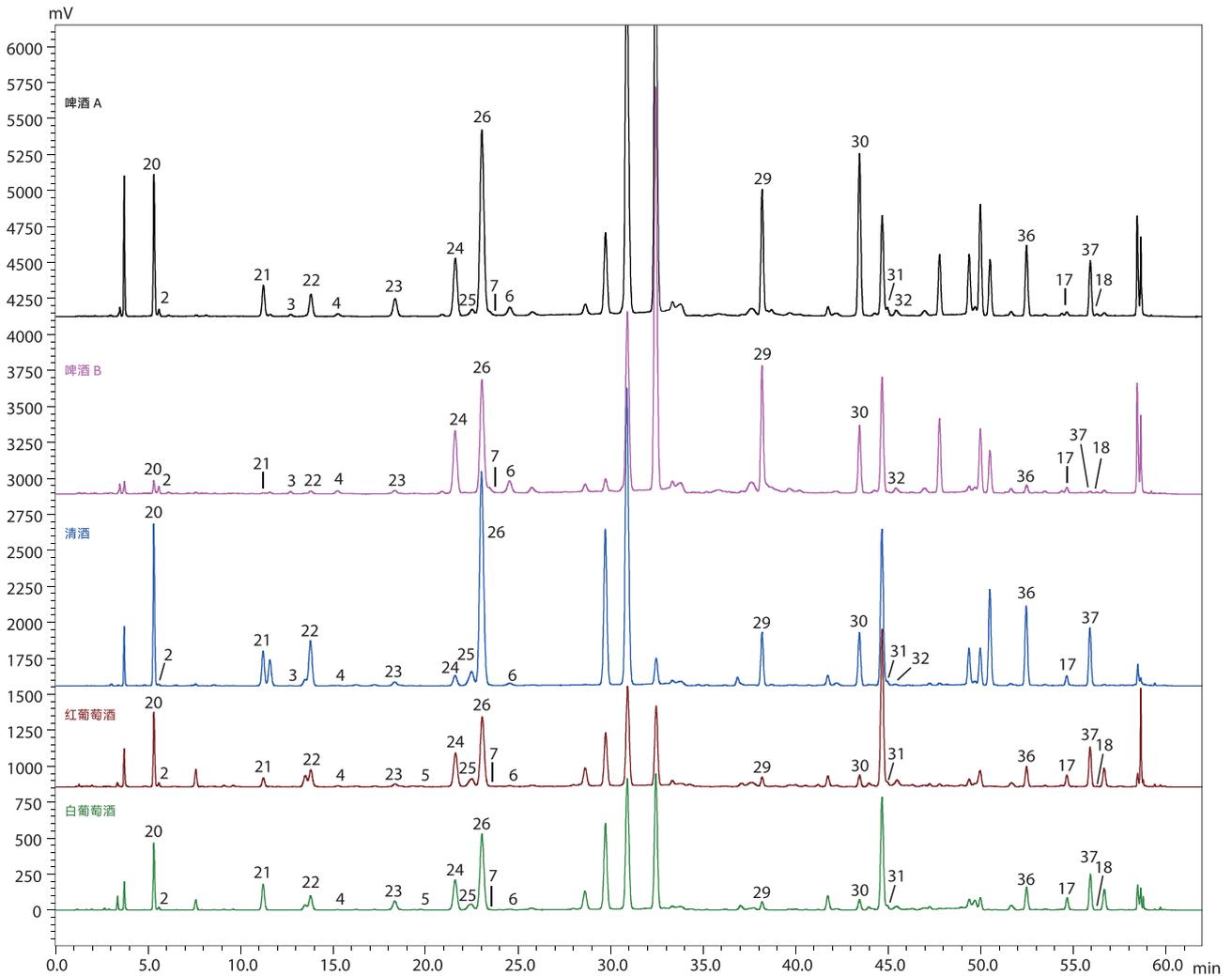


图 6 酒类样品的色谱图 (OPA/NIBC 衍生法)

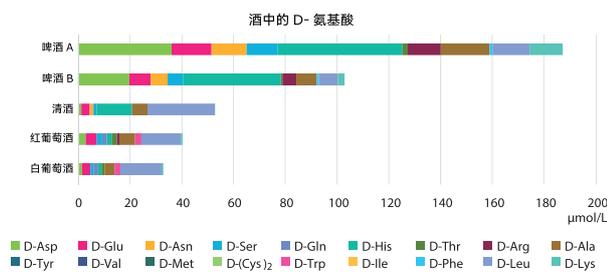
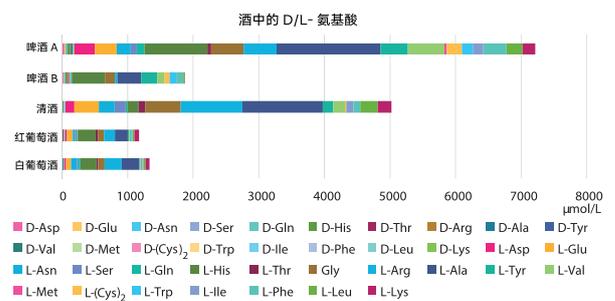


图 7 酒类样品中的 D- 氨基酸含量



* 某些 L- 氨基酸的浓度超出了定量范围

图 8 酒样中 D/L- 氨基酸的含量

结论

设计了两种独立的高效液相色谱法的目的是为了对蛋白源 D/L- 氨基酸的两组荧光非对映异构体进行互补分离。通过衍生化和顺序方法切换分析这两个自动化程序，可以完整测定 37 种 D/L- 氨基酸。

在不使用质谱仪或复杂的多维 HPLC 设置的情况下，只需使用简单的 HPLC 配置即可进行分析并得出可靠结果。

岛津应用云



Nexera、Shim-pack Scepter 和 SHIMADZU LabTotal 是岛津公司在日本和 / 或其他国家的商标。



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: 2021 年 6 月