

# 用于微量 D- 氨基酸定量的高灵敏度分析方法的发展

中野 洋介、福崎 英一郎  
 大阪大学研究生院工学研究科生物工程专业



Food

## 摘要

考虑氨基酸的立体结构时，其他包含对映异构体，分别分为 L- 氨基酸 (L- 型) 和 D- 氨基酸 (D- 型)。大多数天然存在的氨基酸都属于 L- 型，而 D- 型的功能过去没有受到太多关注。但是，近年来的研究表明，部分仪器、特别是有微生物参与的发酵食品中包含了 D- 氨基酸，其食品功能受到了广泛关注。在此背景下，笔者应用在代谢组学中积累的分析技术，使用高灵敏度三重四级杆质谱仪开发了一种新型 D- 氨基酸分析方法。本文在介绍该方法的同时，介绍了在发酵食品分析中的应用案例。

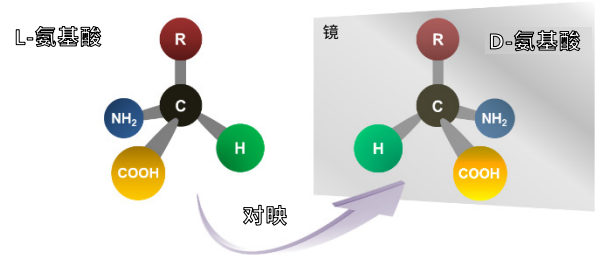


图 1 氨基酸的对映异构体  
 R 表示侧链

## 1. D- 氨基酸研究的现状

在 20 种蛋白质氨基酸中，除甘氨酸外的所有氨基酸都有一个或两个手性中心，该手性中心将四个不同的官能团或原子连接在同一个碳上，且分别作为立体异构体而存在。为了区分上述构型，通过使用 D/L 表述方法表述氨基酸。而且，每个氨基酸的 D-型和 L- 型呈原子排列彼此不重叠的镜像对映体（对映异构体、对映体）的关系（图 1）。

在自然界中，L- 型占绝大多数，长期以来，人们认为地球上所有的生物都是以 L- 型为基础的，但在 20 世纪中叶有报告称，在细菌细胞壁的肽聚糖层上包含了 D- 丙氨酸和 D- 谷氨酸<sup>1)</sup>，并且，在自然界中不仅存在 L- 型，而且存在 D- 型的认识得到广泛认知。

近年来，人们在不断研究与多种疾病的相关性，认为 D- 丝氨酸可能对阿尔茨海默病、精神分裂症、ALS (amyotrophic lateral sclerosis、肌萎缩侧索硬化) 等神经系统疾病的病理生理造成影响<sup>2), 3)</sup>。另外，有报告称，D- 丝氨酸与肾功能障碍密切相关，有望作为肾脏疾病的预后预测和新型生物标志物使用<sup>4), 5)</sup>。

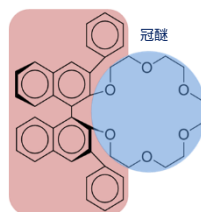
如上所述,从生理学的角度来说,对 D-氨基酸的研究在医学领域取得了很大进展,近年来,在食品研究领域也开展了广泛的研究。过去有报告称,在蔬菜、水果等的农作物<sup>6),7)</sup>、海产品<sup>8)</sup>以及发酵食品中含有 D-氨基酸。特别是在关于发酵食品的报道中,研究对象涉及葡萄酒、啤酒、清酒、酸奶、奶酪、醋、酱油、料酒等方方面面,一般理解为,参与发酵的微生物的波动和熟成过程中的生化变化是形成各种 D-氨基酸的原因之一<sup>9)~11)</sup>。食品的功能大致分为作为主要功能的营养功能、作为次要功能的可口功能、作为三级功能的保健功能,而作为食品中包含的成分, D-氨基酸的功能主要是其中的次要功能,特别是体现独特风味的性质,即与增味性相关的性质。以 L-谷氨酸单钠作为鲜味调味品为代表,氨基酸在食品的制造和烹饪过程中作为增味剂发挥着重要的作用,而 L-型和 D-型所体现的口感和阈值存在差异<sup>12)</sup>。过去,通过氨基酸溶液的口感评价和味觉受体的分析证实,几乎所有的蛋白质构成氨基酸的 L-型都呈苦味,而很多的 D-型则呈甜味<sup>13),14)</sup>。作为食品添加剂使用的只有 L-型,尽管有将 D-型作为新型增味物质使用的动向,但在日本厚生劳动省的规定中允许使用丙氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、色氨酸的 D-型,而且,各种氨基酸只能作为外消旋体使用,即,只有在 D-型和 L-型等量使用时才能作为食品添加剂使用,鉴于这种限制,目前无法使用 D-氨基酸独特的增味性积极开展具有独创性的食品开发工作。

如上所述,氨基酸的 D-型在生命现象的各种场景表现出 L-型所没有的独特的生物学功能,因此,在基础和应用的两个层面开展了综合性研究工作。以医疗和食品科学为首的各领域取得新的知识与经验很大程度上取决于近年来分析技术的巨大进步,但仍处在发展阶段。在定量或定性的性能方面仍有很大的改进空间,需要进一步推进技术开发工作。

## 2. 氨基酸的光学拆分技术

近年来,该研究室开发了新型 D-氨基酸分析方法<sup>15)</sup>。在该方法中,手性氨基酸的分离和检测分别使用了 HPLC 和飞行时间质谱仪 (TOFMS)。该方法中分离部分的手性固定相使用的是拥有联萘骨架的冠醚色谱柱 CROWNPAK® CR-I(+). 该方法的 D, L-氨基酸手性分离原理尚处于等待详细说明的阶段,但推测采用了如下所示的分离机制 (图 2)。目标氨基酸所具有的氨基通过 LC 中使用的极低 pH 流动相质子化。该质子化氨基与固定相中的冠醚之间形成静电引力,形成氨基酸保留。同时,具有极高松散结构的联萘与冠醚键合,在实现疏水保留的同时,在 D 和 L-氨基酸中形成不同的位阻。此外,质子化氨基酸的氨基和固定相的填料颗粒孔中的静电排斥也会影响分离。上述手性选择剂和固定相的贡献使得非衍生化的 D、L-氨基酸得以分离,估计该选择性是通过反相分配、亲水相互作用和静电消除的混合模式获得的<sup>16)</sup>。

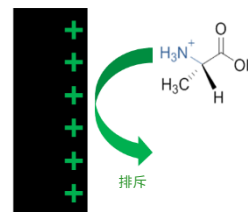
### • 手性选择器的贡献



联萘

基于联萘的疏水保留和基于位阻冠醚的静电引力

### • 固定相的贡献



固定相

填料颗粒孔隙的有效部分形成静电排斥

图 2 Konya et al.<sup>16)</sup> 开发的 D-氨基酸分析方法的推测分离机制

使用 HPLC 和 TOFMS 的手性氨基酸分析法 (LC-TOFMS 法) 的特点有三个。第一点是该方法不需要进行氨基酸的衍生化。可以避免衍生化过程中产生的令人担忧的各种问题,例如不必要的副反应。第二点是分析的高通量。该方法可以在 10 分钟内完全分离除仲胺脯氨酸以外的所有蛋白氨基酸。有很多的方法报告称,手性氨基酸的分析需要数小时以上时间,而该方法的高通量可以说是在分离方面取得了堪称划时代的成果。第三个特点是使用质量分辨率高的质谱仪。通过使用 TOFMS,可以进行精确的质谱分析,并能以高定性能力区分分子量非常接近的目标氨基酸。LCTOFMS 方法的所有这些特点都值得重点关注,其定位是区别于常规的 D-氨基酸分析方法,但是,从分析的检测面,尤其是在提高灵敏度和动态范围方面,TOFMS 存在原理方面的障碍。

基于上述背景,笔者开发了使用岛津制作所的高灵敏四极杆质谱仪 LCMS™-8060 的新型 D-氨基酸分析方法。在四极杆质谱仪的离子分离部分,同时将高频电压和直流电压施加到四个金属棒上,使特定质谱范围的离子通过。四极杆质谱仪的测定模式可以分为 Scan 模式和 SIM 模式,分析目标化合物时,使用只检测特定质谱的第二种模式。所使用的 MS/MS 具有在质谱分离的部分配置了两个四极杆,并且在四极杆之间配置碰撞室的结构。在 MS/MS 分析中常用的 MRM 模式是在两个四极杆上均使用 SIM 模式,以获得对检测离子的高选择性,同时可以减少来自污染物离子的背景噪声的影响,可以检测到灵敏度相对较高的信号。另外,如上所述,MS/MS 具有较宽的动态范围,因此适用于浓度差异和丰度比显著不同的目标化合物的综合测定。

在本研究中构建分析技术时,我们首先通过微调 MS/MS 的参数,开发了一种对微量 D-氨基酸进行高灵敏度分析的方法。然后,将开发的方法和现有方法的性能进行了比较评价。以下为您介绍该研究结果。

### 3. 开发有助于定量分析微量 D- 氨基酸的高灵敏度分析方法

开发可以使用 LC-MS/MS 对微量 D- 氨基酸进行高灵敏度定量分析的方法时，分成 1. “分析方法的发展”、2. “所开发分析方法的评价”、3. “在实际样品分析中的应用”等的三个项目，分阶段进行了研究。以下介绍各项的概要。

#### 1. “分析方法的发展”

关于手性氨基酸的分离，我们尝试了应用 Konya et al. 报告的使用 LC-TOFMS 的 D- 氨基酸分析方法<sup>15)</sup>。在检测方面，为了实现最高灵敏度分析，对影响灵敏度的参数逐个进行了详细研究。本研究中使用的 MS/MS 的装置构成简图如下所示（图 3）。LC 分离的化合物首先被离子源电离（质子加成反应），然后被透镜系统聚焦，进入质量分离器，最后到达检测器。首先，在最初的研究时，决定了通过两个四极杆的离子的  $m/z$  和电压参数，即，对 MRM 通道进行了优化。然后，在调整离子源探头位置后，对气体流量参数进行了优化。在离子源的接口部分使用了几种气体来促进电离。此外，还优化了该界面部分的电压和热参数。

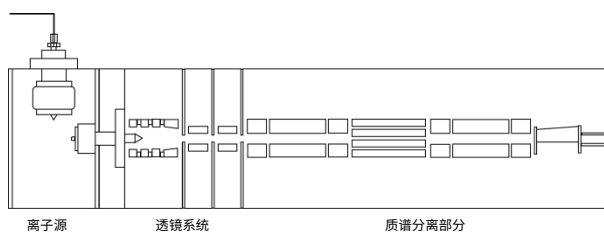


图 3 三重四极杆质谱仪的装置构成简图

#### 2. “所开发的分析方法的评价”

使用氨基酸标准品的稀释系列评价了测定范围、线性、重复性、检出限和定量下限。线性范围评价了依据 0.005 至 100 nmol/mL 浓度范围的标准品溶液的各浓度面积值进行线性回归时的相关系数，再现性通过  $N = 3$  的重复数量的检测峰值面积值的相对标准偏差进行了评价。另外，检出限通过质谱仪的信噪比求得。

#### 3. “在实际样品分析中的应用”

在本过程中，除标准品溶液之外，还对开发的分析方法是否可以应用于含有杂质的实际样品分析进行了验证。实际样品使用的是曾有 D- 氨基酸检出报告的黑醋。

另外，对使用通过上述 1 至 3 的阶段确立的方法和现有的使用 LC-TOFMS 的 D- 氨基酸分析方法分析同一个样品得到的结果进行比较，评价了新分析方法的性能。

### 3-1 分析方法的发展

开发 LC-MS/MS 的高灵敏度 D- 氨基酸分析方法时，首先完成目标氨基酸的 MRM 通道优化，然后确认了手性氨基酸分离条件。LC 的分离条件依据现有的 LC-TOFMS 法<sup>15)</sup>进行了研究。如上所述，本方法使用了具有在联萘骨架中键合了冠醚的手性选择器的色谱柱（CROWNPAK CR-I(+)），判断固定相的冠醚与目标氨基酸的氨基的相互作用以及联萘骨架所带来的位阻对 D, L- 氨基酸的光学拆分造成了重大影响（图 4）。

本方法同样具有极高的分离性能，完成了几乎所有的目标 D, L- 氨基酸的光学拆分（图 4）。但是，与 LC-TOFMS 法不同的是，在本方法中，MS/MS 将 L- 谷氨酰胺和 D- 赖氨酸识别为同一化合物。其原因是二者以相近的保留时间洗脱，并具有相同的 MRM 通道。TOFMS 可以从化合物的精确质谱中获取数据，因此，即使使用 LC 难以分离，也可以使用 MS 进行分离。使用的 MS/MS 的质量分辨率无法识别各自的质量差（单同位素质量中的谷氨酰胺为 146.069，赖氨酸为 146.106）。为了解决这个问题，我们研究了使用与 CROWNPAK CR-I(+) 具有互补结构的色谱柱 CROWNPAK CR-I(-)。CROWNPAK CR-I(+) 和 CROWNPAK CR-I(-) 内的联萘存在轴不对称关系（CR-I(+): (S)-18-crown-6-ether、CR-I(-): (R)-18-crown-6-ether）（图 5）。目前尚未获得详细的知识和经验，但在使用两种色谱柱分离 D, L- 氨基酸时，上述洗脱顺序出现逆转。即，在本方法中，使用 CR-I(+) 时，先洗脱 D- 氨基酸，然后洗脱 L- 氨基酸，而使用 CR-I(-) 时，先洗脱 L- 氨基酸。因此，通过使用 CR-I(+) 和 CR-I(-)，可以作为单峰分别检出同时洗脱的 L- 谷氨酰胺和 D- 赖氨酸（图 6）。另外，同样共洗脱的 D- 异亮氨酸和 D- 别异亮氨酸也可以分别识别为单峰。此外，通过设置，在采集数据时仅在预期保留时间前后 0.75 分钟进行监测，减少了一次分析所需的 MRM 通道采集次数，以获得更高的再现性。

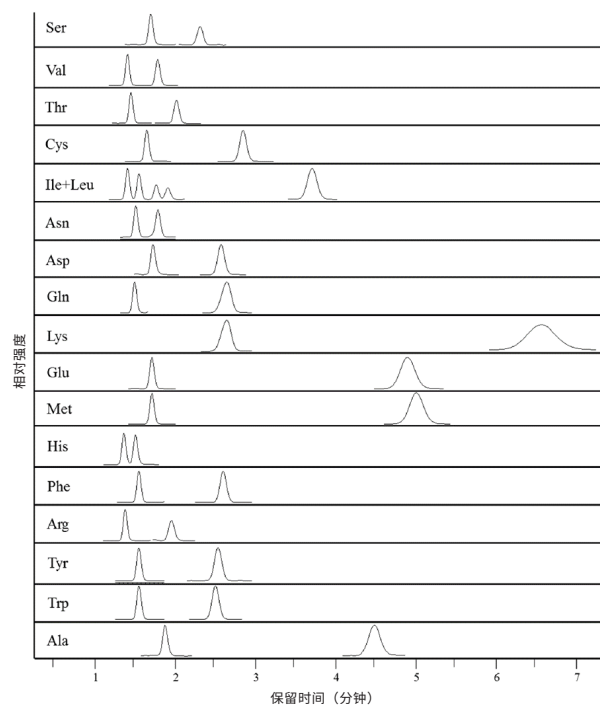


图 4 18 种蛋白质构成氨基酸的色谱图

所使用的 DL- 氨基酸标准溶液为 1 nmol/mL，所有化合物均在 8 分钟以内洗脱。

在使用 CROWNPAK CR-I(+) 的分析中，所有的氨基酸均呈 D- 型、L- 型的洗脱顺序。异亮氨酸和亮氨酸按照 D- 异亮氨酸 + D- 别异亮氨酸（共洗脱）、D- 亮氨酸、L- 别异亮氨酸、L- 异亮氨酸、L- 亮氨酸的顺序洗脱。

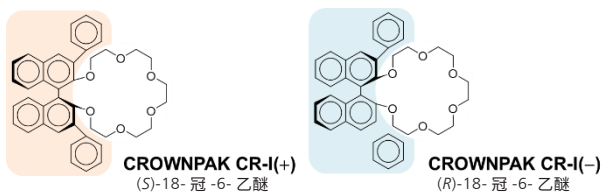


图 5 CROWNPAK CR-I(+) 及 CR-I(-) 中的手性选择器结构

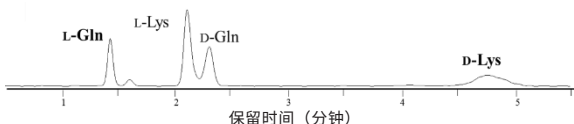


图 6 使用 CROWNPAK CR-I(-) 获得的谷氨酰胺和赖氨酸的提取离子色谱图

然后，对离子源的电喷雾探针位置进行了调整。探针的位置在很大程度上取决于流动相的去溶剂化和目标化合物电离过程中的电离效率，会对提高灵敏度造成影响，近年来，有对离子源的位置参数和灵敏度进行了详细调查的报告<sup>17)</sup>。在本方法中，通过将喷针从 MS 引入的默认位置移开，极大的提高了灵敏度。在甘氨酸、丙氨酸等的低分子氨基酸中，这种倾向更为明显。在 MS 优化的最后阶段，对接口的参数（雾化气、加热气、干燥气）热参数（脱溶剂管温度、加热块温度）以及接口电压进行了微调。岛津制作所的 LCMS-8060 能够对上述 MS 参数进行详细的研究，用户界面的易用性也是其一大特色。

### 3-2 所开发的分析方法的评价

通过调查测定范围、线性、重复性、检出限以及定量下限，对使用优化的 LC-MS/MS 进行手性氨基酸分析的方法进行了评价（表 1）。评价时使用了氨基酸标准溶液的稀释系列（0.005、0.01、0.05、0.5、1、5、50、及 100 nmol/mL），通过用分析获得的各氨基酸面积值数据除以 IS（内标物质）的峰面积值，补偿了分析时可能产生的进样误差等。在本研究中，各验证项目依据以日美 EU 药品注册技术要求国际协调会议（ICH）规定的分析方法开发中的验证指南为首的各项标准进行了评价。测定范围是在综合考虑两端分析值的准确度和精度后确定的，针对 D- 蛋氨酸、D- 天冬氨酸、D- 谷氨酰胺、D- 谷氨酸取最大的直线范围（0.005–100 nmol/mL），所有目标氨基酸在各测定范围内的相关系数均为 0.99 以上，呈较高的数值。上述结果表明，LC-MS/MS 法可以在很宽动态范围内定量 D- 氨基酸。

重复性通过连续分析氨基酸标准溶液 3 次得到的各峰面积值的相对标准偏差 (RSD) 进行了评价。除 D- 丙氨酸之外，所有目标氨基酸在 0.05 nmol/mL 下呈平均 8.1% 的 RSD，D- 丙氨酸在 0.5 nmol/mL 下呈 15.9% 的 RSD。所有峰面积值的 RSD 呈 20% 以下的值，表明 LC-MS/MS 法保持了较高的再现性。检测限和定量下限是分别由检测到的目标化合物的峰（信号）比噪声强 3 倍以上和 10 倍以上时的浓度值确定的。噪声是根据目标化合物检测前后区间中测量点信号的标准偏差计算的。检出限值在 0.005 – 0.5 nmol/mL 的范围内，各种氨基酸的检出限呈不同的值，但在几 pmol 量级下可检测到 D- 氨基酸，本方法取得了可用于实际样品微量分析的良好结果。

表 1 构建的 LC-MS/MS 法的性能评价

	范围 (nmol/mL)	r	RSD (%)	LOD (nmol/mL)	LOQ (nmol/mL)
D- 丙氨酸	0.5-100	0.9979	15.9	0.01	0.05
D- 精氨酸	0.005-50	0.9997	4.7	0.005	0.005
D- 天冬酰胺	0.01-50	0.9983	0.7	0.005	0.01
D- 天冬氨酸	0.01-100	0.9934	18.2	0.005	0.01
D- 半胱氨酸	0.01-100	0.9982	7.1	0.005	0.005
D- 谷氨酰胺	0.005-50	0.9998	10.3	0.005	0.005
D- 谷氨酸	0.005-50	1.0000	7.3	0.005	0.005
D- 组氨酸	0.005-50	0.9997	9.0	0.005	0.005
D- 异亮氨酸	0.01-50	0.9998	5.8	0.005	0.005
D- 亮氨酸	0.01-50	0.9996	11.5	0.005	0.01
D- 赖氨酸	0.01-100	0.9994	5.8	0.005	0.01
D- 蛋氨酸	0.005-100	0.9975	6.6	0.005	0.005
D- 苯丙氨酸	0.05-50	0.9996	18.7	0.005	0.05
D- 丝氨酸	0.05-100	0.9952	12.5	0.005	0.5
D- 苏氨酸	0.05-100	0.9970	11.7	0.005	0.01
D- 色氨酸	0.005-50	0.9993	2.9	0.005	0.005
D- 酪氨酸	0.005-50	0.9987	4.3	0.005	0.05
D- 缬氨酸	0.01-50	0.9999	2.1	0.005	0.01

r: 相关系数、RSD: 相对标准偏差、LOD: 检出限、LOQ: 定量下限

### 3-3 在实际样品分析中的应用

为了评价 LC-MS/MS 方法在手性氨基酸分析中的实用性，将本方法用于食品中所含 D-氨基酸的定量分析。准备了在市面上可买到的三种黑醋样品。研究表明，醋中含有多种 D-氨基酸<sup>18, 19</sup>，有报告称，以乳酸菌为首的多种细菌对醋中 D-氨基酸的生成发挥了重要作用<sup>10</sup>。首先，对三种黑醋进行了预处理。预处理方法采用了充分考虑了回收率和对 LC-MS 分析的影响的现有方法<sup>20</sup>。D-氨基酸的定量采用了通过氨基酸标准溶液稀释系列的分析得到的各峰面积值绘制的标准曲线。其中，用于定量的稀释系列也和醋一样进行了预处理，对提取误差进行了补偿。另外，作为 IS，在所有的分析目标试剂瓶中含有相同浓度的 DL-丙氨酸-2,3,3-d<sub>4</sub>，考虑到进样和电离时的误差，使用 D-丙氨酸-2,3,3-d<sub>4</sub> 的分析值对各种数据进行了补偿。使用 CROWNPAK CR-I(+) 进行目标 D-氨基酸的同时分析，D-赖氨酸的检测和 D-异亮氨酸与 D-别异亮氨酸的峰鉴定使用了 CROWNPAK CR-I(-)。

通过 LC-MS/MS 分析，从醋中检测出 14 种 D-氨基酸 (D-丙氨酸、D-丝氨酸、D-缬氨酸、D-苏氨酸、D-别异亮氨酸、D-亮氨酸、D-天冬酰胺、D-谷氨酸、D-蛋氨酸、D-组氨酸、D-苯丙氨酸、D-精氨酸、D-酪氨酸、及 D-赖氨酸)，并进行了定量。在三种醋中检测到的 D-氨基酸种类呈类似的倾向，但各种醋的浓度存在差异。然后，将相同样品在 24 小时内进行了 LC-TOFMS 分析。为了比较两种分析方法的结果，包括 LC 分离条件在内的所有分析条件均已统一。通过分析，使用 LC-TOFMS 法在所有醋中检测到 13 种 D-氨基酸 (D-丙氨酸、D-丝氨酸、D-缬氨酸、苏氨酸、D-别异亮氨酸、D-亮氨酸、D-天冬酰胺、D-谷氨酸、D-蛋氨酸、D-组氨酸、苯丙氨酸、D-精氨酸、及 D-酪氨酸)，并进行了定量。通过 LCMS/MS 法和 LC-TOFMS 法得到的 D-氨基酸定量值非常接近 (图 7)。结果表明，LC-MS/MS 法可以作为传统的 LC-TOFMS 法的替代方法使用。此外，所有醋中的 D-赖氨酸、醋 C 中的 D-缬氨酸未使用 LC-TOFMS 法进行检测，只使用 LC-MS/MS 法进行了检测和定量。上述结果表明，LC-MS/MS 法在定量方面具有优势，可以成为对实际样品中所含微量 D-氨基酸进行定量分析的有效方法。

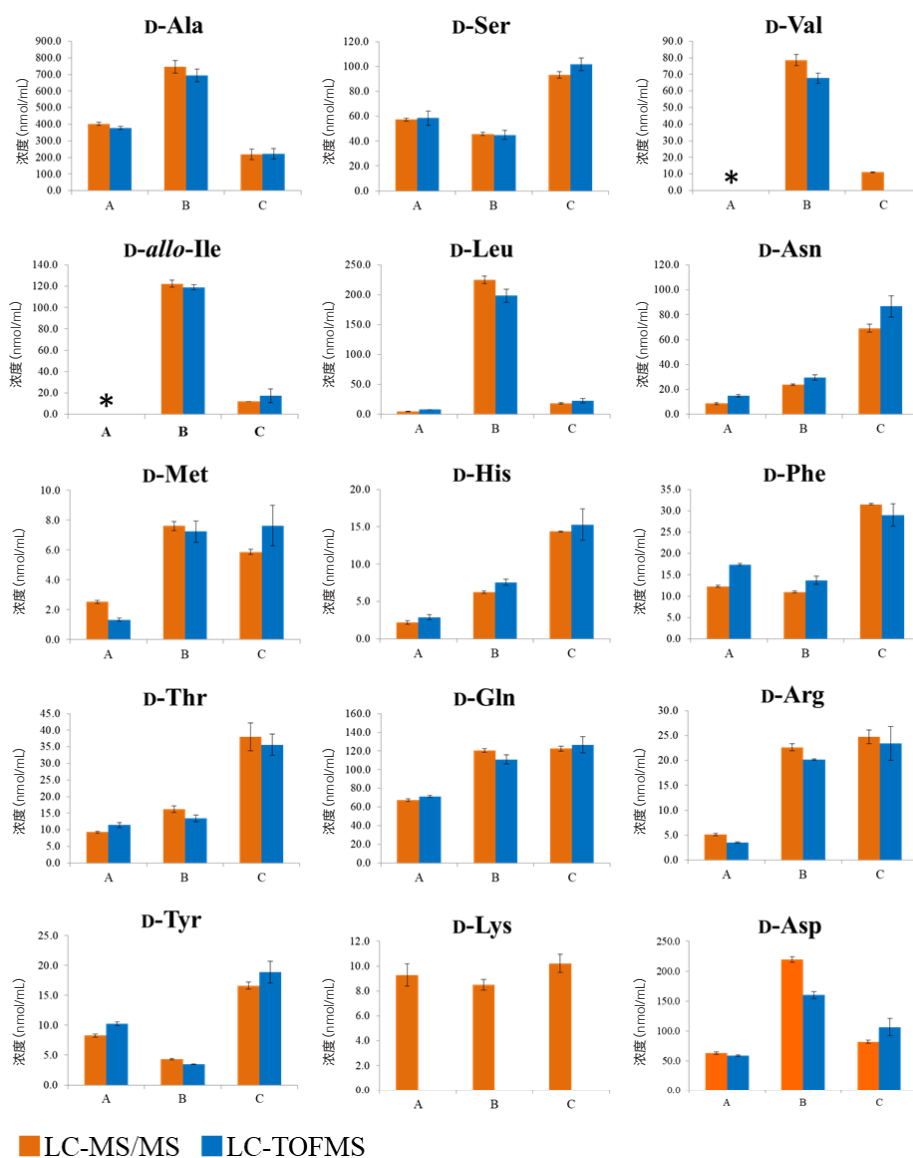


图 7 LC-MS/MS 及 LC-TOFMS 分析中的黑醋 D-氨基酸定量值

橙色的柱形图表示通过 LC-MS/MS 法、蓝色的柱形图表示通过 LC-TOFMS 法得到的黑醋 A、B、C 中所含各种 D-氨基酸的浓度 (N = 3)。图中的星号 (\*) 表示检测到了峰，但呈定量下限以下的浓度。

## 4. 结语

在本研究中，开发了有助于高灵敏度地定量分析微量 D-氨基酸的 LC-MS/MS 分析方法。首先，对 MS/MS 的 MRM 通道进行优化，详细研究了接口的探针位置、温度、气体流量、电压等的各种参数，提高了目标氨基酸检测灵敏度。在分离方面，部分氨基酸出现共流出，存在无法作为单峰识别出来的问题，但通过使用与现有色谱柱具有互补结构的色谱柱，成功完成了所有目标氨基酸的分析。然后，通过了测定范围、线性、重复性、检出限和定量下限对开发的方法进行验证，评价了作为微量 D-氨基酸定量分析方法的性能。此外，将开发的方法应用于实际样品（黑醋）中所含 D-氨基酸的定量分析。与传统的 LC-TOFMS 方法的结果比较，可以获得基本类似的 D-氨基酸谱，但有一些 D-氨基酸只能通过 LC-MS/MS 方法进行定量，从检测灵敏度的角度来说，具有较大的优势。

曾经有几份关于使用 LC-MS/MS 分析微量 D-氨基酸的报告，但这里介绍的新 LC-MS/MS 法的一大特色是不需要进行衍生化，能够以高通量和高灵敏度同时分析手性氨基酸，可以在短时间内处理多个样品是本分析方法的巨大优势。

### <参考文献>

- 1) Stevens, C.M., Halpern, P.E., Gigger, R.P.: Occurrence of D-amino acids in some natural materials. *J. Biol. Chem.*, 190, 705–10 (1951).
- 2) Nishikawa, T.: Analysis of free D-serine in mammals and its biological relevance. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 879, 3169–3183 (2011).
- 3) Sasabe, J., Chiba, T., Yamada, M., Okamoto, K., Nishimoto, I., Matsuoka, M., Aiso, S.: D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.*, 26, 4149–59 (2007).
- 4) Sasabe, J., Suzuki, M., Miyoshi, Y., Tojo, Y., Okamura, C., Ito, S., Konno, R., Mita, M., Hamase, K., Aiso, S.: Ischemic Acute Kidney Injury Perturbs Homeostasis of Serine Enantiomers in the Body Fluid in Mice: Early Detection of Renal Dysfunction Using the Ratio of Serine Enantiomers. *L. R. James, ed. PLoS One*, 9, e86504 (2014).
- 5) Kimura, T., Hamase, K., Miyoshi, Y., Yamamoto, R., Yasuda, K., Mita, M., Rakugi, H., Hayashi, T., Isaka, Y.: Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease. *Sci. Rep.*, 6, 26137 (2016).
- 6) Brückner, H., Westhauser, T.: Chromatographic determination of D-amino acids as native constituents of vegetables and fruits. *Chromatographia*, 39, 419–426 (1994).
- 7) Gandolfi, I., Palla, G., Marchelli, R., Dossena, A., Puelli, S., Salvadori, C.: D-alanine in Fruit Juices: A Molecular Marker of Bacterial Activity, Heat Treatments and Shelf-life. *J. Food Sci.*, 59, 152–154 (1994).
- 8) Abe, H., Yoshikawa, N., Sarower, M.G., Okada, S.: Physiological Function and Metabolism of Free D-Alanine in Aquatic Animals. *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 1571–1577 (2005).
- 9) Friedman, M.: Chemistry, Nutrition, and Microbiology of d-Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3457–3479 (1999).
- 10) Mutaguchi, Y., Ohmori, T., Akano, H., Doi, K., Ohshima, T.: Distribution of D-amino acids in vinegars and involvement of lactic acid bacteria in the production of D-amino acids. *Springerplus*, 2, 691 (2013).
- 11) Inoue, Y., Katsumata, T., Watanabe, H., Hayase, F.: Mechanisms of d-amino acid formation during maturation of sweet rice wine (mirin). *Food Sci. Technol. Res.*, 22, 679–686 (2016).
- 12) Schiffman, S.S., Sennewald, K., Gagnon, J.: Comparison of taste qualities and thresholds of D- and L-amino acids. *Physiol. Behav.*, 27, 51–59 (1981).
- 13) Kawai, M., Sekine-Hayakawa, Y., Okiyama, A., Ninomiya, Y.: Gustatory sensation of l- and d-amino acids in humans. *Amino Acids*, 43, 2349–2358 (2012).
- 14) Bassoli, A., Borgonovo, G., Caremoli, F., Mancuso, G.: The taste of D- and L-amino acids: In vitro binding assays with cloned human bitter (TAS2Rs) and sweet (TAS1R2/TAS1R3) receptors. *Food Chem.*, 150, 27–33 (2014).
- 15) Konya, Y., Bamba, T., Fukusaki, E.: Extra-facile chiral separation of amino acid enantiomers by LC-TOFMS analysis. *J. Biosci. Bioeng.*, 121, 349–353 (2016).
- 16) Konya, Y., Taniguchi, M., Furuno, M., Nakano, Y., Tanaka, N., Fukusaki, E.: Mechanistic study on the high-selectivity enantioseparation of amino acids using a chiral crown ether-bonded stationary phase and acidic, highly organic mobile phase by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1578, 35–44 (2018).
- 17) Janusson, E., Hesketh, A. V., Bamford, K.L., Hatlelid, K., Higgins, R., McIndoe, J.S.: Spatial effects on electrospray ionization response. *Int. J. Mass Spectrom.*, 388, 1–8 (2015).
- 18) Tani, Y., Itoyama, Y., Nishi, K., Wada, C., Shoda, Y., Satomura, T., Sakuraba, H., Ohshima, T., Hayashi, Y., Yabutani, T., Motonaka, J.: An amperometric D-amino acid biosensor prepared with a thermostable D-proline dehydrogenase and a carbon nanotube liquid gel. *Anal. Sci.*, 25, 919–923 (2009).
- 19) Miyoshi, Y., Nagano, M., Ishigo, S., Ito, Y., Hashiguchi, K., Hishida, N., Mita, M., Lindner, W., Hamase, K.: Chiral amino acid analysis of Japanese traditional Kurozu and the developmental changes during earthenware jar fermentation processes. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 966, 187–92 (2014).
- 20) Konya, Y., Taniguchi, M., Fukusaki, E.: Novel high-throughput and widely-targeted liquid chromatography–time of flight mass spectrometry method for d-amino acids in foods. *J. Biosci. Bioeng.*, 123, 126–133 (2017).

岛津应用云



LCMS 是岛津制作所株式会社在日本和其他国家的商标。

CROWNPAK 大赛璐株式会社在日本和其他国家的商标或注册商标。



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2月