

利用 LC-FL 自动分析酒类中 37 种组分的 D/L- 氨基酸

岩田奈津纪

对用户的好处

- ◆ 只需简单的操作，即可在短时间内分离和定量 37 种组分的 D/L- 氨基酸。
- ◆ 每 20 个样品所需的作业时间和人力可以减少 1 小时以上。
- ◆ 使衍生化反应时间保持恒定，由此，可以获得重现性较高的结果。

■ 前言

氨基酸具有 L 型以及 D 型的对映体（但是，分子内不具有不对称碳原子的甘氨酸除外）。与 L- 氨基酸相比，关于 D- 氨基酸的研究很少，D- 氨基酸对食品和食材的味道、贮藏和香气等方面的作用到现在仍是未知数。然而，众所周知发酵食品和生物样品中除了许多 L- 氨基酸以外还含有多种 D- 氨基酸。由此，氨基酸的 D/L 分离需求也在增加。此外，与 L- 氨基酸相比，D- 氨基酸在食品和体内的含量微乎其微，因此需要与高浓度存在的 L- 氨基酸分离并进行定量。

在本文中，介绍了使用具有手性结构的衍生化试剂以反相模式分离非对映异构体形态的 D/L- 氨基酸并进行荧光检测的结果。同时，还介绍了关于衍生化和分析自动化相关的内容。

■ 手性衍生化

为了进行手性衍生化，使用了 N- 乙酰基-L- 半胱氨酸 (NAC) 和 N- 异丁酰基-L- 半胱氨酸 (NIBC) 两种类型的手性硫醇。在 NAC 或 NIBC 存在下，使邻苯二甲醛 (OPA) 发生反应，对 D/L- 氨基酸进行非对映异构体荧光衍生化。

■ 利用 LC 进行 D/L- 氨基酸分析

通常，利用 HPLC 分析 D/L 氨基酸时，由于在单一分析条件下难以分离所有的组分，因此，将使用 LC/MS 或二维 LC 等。但是，LC/MS 分析易受基质效应的影响，与其他 LC 的检测器相比，具有定量性差的问题。此外，众所周知二维 LC 法需要进行长时间的分析。因此，需要建立一种在短时间内以简单的操作进行分离和定量的方法。

此外，在分析食品中的 D/L- 氨基酸时，为了与高浓度存在的 L- 氨基酸和杂质成分进行分离分析，将使用小粒径的色谱柱。

由此，系统负载压力升高，因此本文中使用了具备系统耐压 130 MPa 的 Nexera X3。

■ 分析条件和自动化讨论

表 1 所示是 37 种 D/L 氨基酸目标成分（在蛋白氨基酸中，D/L- 脯氨酸除外）。另外，表中的背景色表示衍生化试剂的种类。也就是说，红色表示 OPA/NAC 衍生化的氨基酸，蓝色表示 OPA/NIBC 衍生化的氨基酸。

图 1 所示为自动化系统的示意图。在本研究中，使用送液泵的流动相混合功能自动制备流动相，并且同时自动切换两种分析条件。此外，使用自动进样器的自动预处理功能进行了 D/L- 氨基酸的衍生化。表 2 所示的两种分析条件的不同之处为流动相的有机溶剂比例和梯度时间程序（粗体部分）。使用上述流动相混合功能，只需设定有机溶剂的原液即可按照指定的混合比例输送液体。此功能不仅可用于分析，还可用于切换分析条件时所需的流动相更换，削减了人力和作业时间。此外，使用自动预处理功能，只需在自动进样器中设置装有 OPA/NAC 溶液、OPA/NIBC 溶液以及样品的小瓶，即可执行在针头内自动混合的预处理程序，因此，直接将衍生化样品用于分析（表 3、4）。图 2 所示为工作站 LabSolutions™ 上的预处理程序设置画面。这样，通过使用自动进样器进行自动的柱前荧光衍生化，不再需要复杂的手动预处理，可以使从衍生化到开始分析的时间保持恒定。此外，由于不再需要用于衍生化的小瓶，因此可降低成本。

本次分析了 20 个样品，与手动操作相比，可以将总作业时间和人力减少 1 小时以上（表 5）。另外，本文的分析可以通过图 1 所示的简单装置配置来实现。

表 1 目标成分

1	D- 天冬氨酸	8	D- 精氨酸	15	D- 异亮氨酸	22	L- 丝氨酸	29	L- 酪氨酸	36	L- 亮氨酸
2	D- 谷氨酸	9	D- 丙氨酸	16	D- 苯丙氨酸	23	L- 谷氨酰胺	30	L- 缬氨酸	37	L- 赖氨酸
3	D- 天冬酰胺	10	D- 酪氨酸	17	D- 亮氨酸	24	L- 组氨酸	31	L- 蛋氨酸		
4	D- 丝氨酸	11	D- 缬氨酸	18	D- 赖氨酸	25	L- 苏氨酸	32	L- (半胱氨酸) 2		
5	D- 谷氨酰胺	12	D- 蛋氨酸	19	L- 天冬氨酸	26	甘氨酸	33	L- 色氨酸		
6	D- 组氨酸	13	D- (半胱氨酸) 2	20	L- 谷氨酸	27	L- 精氨酸	34	L- 异亮氨酸		
7	D- 苏氨酸	14	D- 色氨酸	21	L- 天冬酰胺	28	L- 丙氨酸	35	L- 苯丙氨酸		

※ 背景颜色（红色：OPA/NAC 衍生化、蓝色：OPA/NIBC 衍生化）

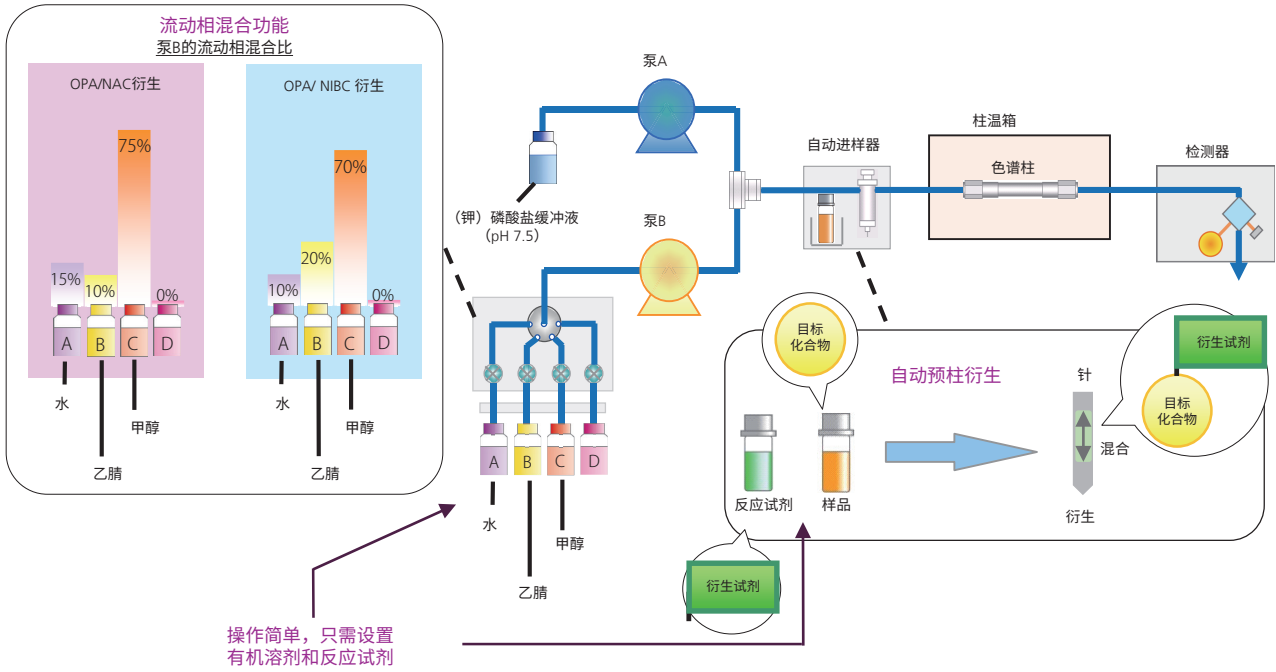


图 1 流动相混合功能和自动柱前衍生化

表 2 分析条件

系统	Nexera X3	
色谱柱	<OPANAC 衍生> Shim-pack Scepter™ 1.9 μm C8 ¹ (150 mm×3.0 mm 内径, 1.9 μm)	<OPANIBC 衍生> Shim-pack Scepter 1.9 μm C8 (150 mm×3.0 mm 内径, 1.9 μm)
流速	0.6 mL/min	
流动相	<泵 A> 10 mmol/L (钾) 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) ※ <泵 B> 流动相混合 A) 水 B) 乙腈 C) 甲醇 A/B/C=15:10:75	<泵 A> 10 mmol/L (钾) 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) <泵 B> 流动相混合 A) 水 B) 乙腈 C) 甲醇 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	
进样量	1 μL	
样品瓶	SHIMADZU LabTotal™ 用于 LC 1.5 mL, 玻璃 ^{*2}	
检测波长 (FL)	RF-20AXS, Ex: 350 nm, Em: 450 nm	

*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, 并完全溶解。

表 3 使用自动进样器进行自动柱前衍生化的概要

<OPANAC 衍生>	<OPANIBC 衍生>
① OPANAC 溶液 4 μL	① OPANIBC 溶液 4 μL
② 样品 1 μL	② 样品 1 μL
③ 混合	③ 混合
④ 进样方式	④ 进样方式

表 4 衍生化试剂的制备

OPA 试剂	将 0.3 mL 乙醇加入 10 mg 邻苯二甲醛中, 并完全溶解。然后添加 0.7 mL 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液和 4 mL 的超纯水。
0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液	在 100 mL 超纯水中添加 0.62 g 磷酸和 0.20 g 氢氧化钠, 并完全溶解。
NAC 溶液	将 20 mg N-乙酰基-L-半胱氨酸添加到 10 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中。
NIBC 溶液	将 20 mg N-异丁酰基-L-半胱氨酸加入 10 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中。
OPANAC 溶液	混合等体积的 OPA 试剂和 NAC 溶液。
OPANIBC 溶液	混合等体积的 OPA 试剂和 NIBC 溶液。

表 5 自动和手动的比较 (20 种样品的分析)

		自动	手动
流动相制备	缓冲液		5 min
	有机溶剂	○ 0 min ※ 流动相混合功能	× 10 min
用切换分析条件代替流动相		○ 0 min ※ 流动相混合功能	× 10 min
衍生试剂制备			10 min
衍生		○ 0 min ※ 自动预柱衍生	× 50 min
总计		○ 15 min	× 85 min

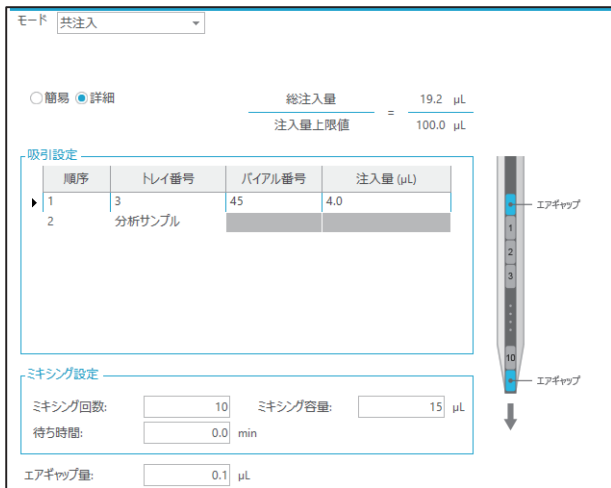


图2 预处理程序的设置画面

D/L-氨基酸标准溶液的分析

图3所示为D/L-氨基酸标准溶液(各5 μmol/L)的色谱图。使用两种手性疏醇,可在总共约120分钟内分离37种组分。

重现性

对于各2 μmol/L的标准溶液,确认了6次重复分析时的保留时间和面积重现性(%RSD)。保留时间和面积重现性的结果分别为0.1%以下和1.5%以下(表6)。

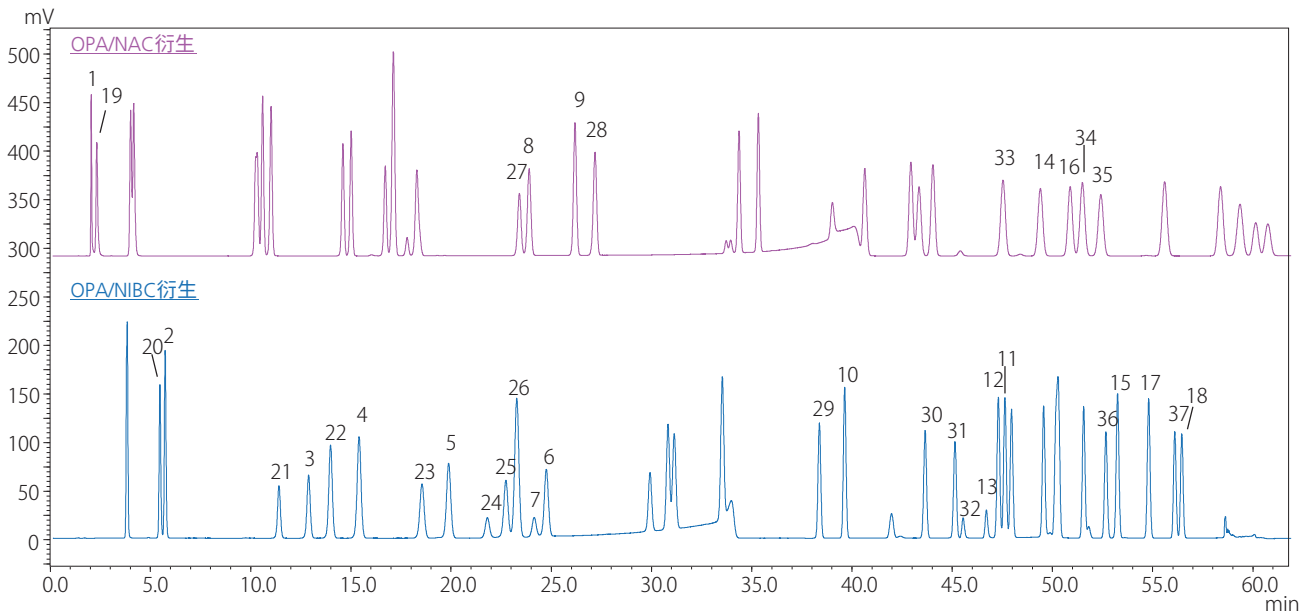


图3 D/L-氨基酸标准溶液(各5 μmol/L)的色谱图

表6 重现性(%RSD, n=6)

化合物	保留时间	面积	化合物	保留时间	面积	化合物	保留时间	面积
1 D-天冬氨酸	0.23	1.50	14 D-色氨酸	0.05	0.42	27 L-精氨酸	0.02	0.18
2 D-谷氨酸	0.09	0.47	15 D-异亮氨酸	0.02	0.38	28 L-丙氨酸	0.03	0.54
3 D-天冬酰胺	0.09	0.29	16 D-苯丙氨酸	0.06	0.51	29 L-酪氨酸	0.02	0.28
4 D-丝氨酸	0.10	0.19	17 D-亮氨酸	0.02	0.30	30 L-缬氨酸	0.01	0.37
5 D-谷氨酰胺	0.09	0.26	18 D-赖氨酸	0.02	0.50	31 L-蛋氨酸	0.01	0.35
6 D-组氨酸	0.07	0.40	19 L-天冬氨酸	0.35	1.32	32 L-(半胱氨酸) ₂	0.02	0.62
7 D-苏氨酸	0.06	0.25	20 L-谷氨酸	0.09	0.44	33 L-色氨酸	0.05	0.44
8 D-精氨酸	0.02	0.19	21 L-天冬酰胺	0.09	0.26	34 L-异亮氨酸	0.06	0.72
9 D-丙氨酸	0.03	0.49	22 L-丝氨酸	0.10	0.19	35 L-苯丙氨酸	0.06	0.52
10 D-酪氨酸	0.01	0.28	23 L-谷氨酰胺	0.10	0.29	36 L-亮氨酸	0.02	0.31
11 D-缬氨酸	0.02	0.62	24 L-组氨酸	0.06	0.40	37 L-赖氨酸	0.02	0.43
12 D-蛋氨酸	0.02	0.35	25 L-苏氨酸	0.07	0.35			
13 D-(半胱氨酸) ₂	0.02	0.38	26 甘氨酸	0.07	0.41			

※ 背景颜色(红色: OPA/NAC 衍生化、蓝色: OPA/NIBC 衍生化)

标准曲线

针对37种目标组分创建标准曲线,所有组分的相关系数均在 $r^2=0.999$ 以上,且线性良好。图4所示为部分化合物的标准曲线,表7所示为标准曲线浓度范围和相关系数。

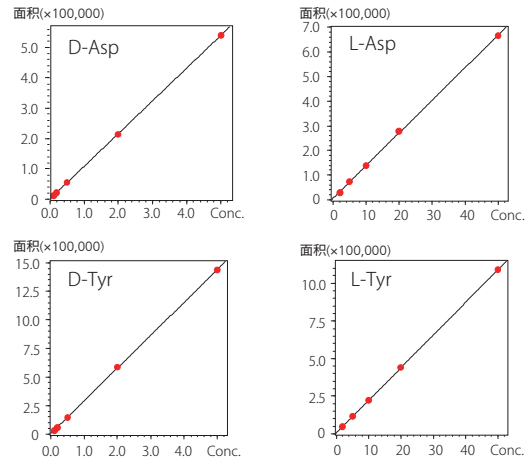


图4 标准曲线

表 7 标准曲线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-天冬氨酸	0.1-5	0.99997	19 L-天冬氨酸	2-50	0.99968
2 D-谷氨酸	0.1-5	0.99986	20 L-谷氨酸	2-50	0.99999
3 D-天冬酰胺	0.1-5	0.99992	21 L-天冬酰胺	2-50	0.99999
4 D-丝氨酸	0.1-5	0.99997	22 L-丝氨酸	0.5-20	0.99996
5 D-谷氨酰胺	0.1-5	0.99997	23 L-谷氨酰胺	0.5-20	0.99995
6 D-组氨酸	0.2-50	0.99995	24 L-组氨酸	0.2-100	0.99991
7 D-苏氨酸	0.1-5	1.00000	25 L-苏氨酸	0.1-10	0.99957
8 D-精氨酸	0.1-20	0.99994	26 甘氨酸	0.5-100	0.99996
9 D-丙氨酸	0.1-5	0.99997	27 L-精氨酸	2-100	0.99993
10 D-酪氨酸	0.1-5	0.99993	28 L-丙氨酸	5-100	0.99951
11 D-缬氨酸	0.1-2	1.00000	29 L-酪氨酸	2-50	0.99998
12 D-蛋氨酸	0.1-5	0.99999	30 L-缬氨酸	2-50	0.99998
13 D-(半胱氨酸) ₂	0.1-5	0.99993	31 L-蛋氨酸	0.1-5	0.99999
14 D-色氨酸	0.1-5	0.99996	32 L-(半胱氨酸) ₂	2-50	0.99995
15 D-异亮氨酸	0.1-5	0.99990	33 L-色氨酸	2-50	0.99994
16 D-苯丙氨酸	0.1-5	0.99997	34 L-异亮氨酸	0.5-20	0.99987
17 D-亮氨酸	0.1-5	0.99996	35 L-苯丙氨酸	2-50	0.99991
18 D-赖氨酸	0.1-5	0.99996	36 L-亮氨酸	2-50	0.99999
			37 L-赖氨酸	0.5-20	0.99993

※ 背景颜色 (红色: OPA/NAC 衍生化、蓝色: OPA/NIBC 衍生化)

应用于酒类

选用了 2 种啤酒、清酒和红/白葡萄酒 (共 5 种) 作为样品。将啤酒 A 以及清酒用 10 mmol/L 盐酸水稀释 5 倍, 将啤酒 B 以及红/白葡萄酒稀释 10 倍, 然后使用 0.2 μm 膜过滤器进行了过滤。

本次样品中使用的所有五种酒精类中所含的 D-氨基酸为 D-天冬氨酸、D-谷氨酸、D-丝氨酸、D-组氨酸、D-丙氨酸和 D-亮氨酸。

此外, 仅葡萄酒中所含的成分为 D-谷氨酰胺和 D-色氨酸, 仅啤酒中所含的成分为 D-苯丙氨酸 (图 5~6)。啤酒 A 与啤酒 B 相比, D-氨基酸含量相差约 2 倍。但是, 啤酒 B 中 D-氨基酸与 D/L-氨基酸的比例比啤酒 A 高出约两倍。并且, 证实与 L 型相比, D 型是微量存在的 (图 7~8)。

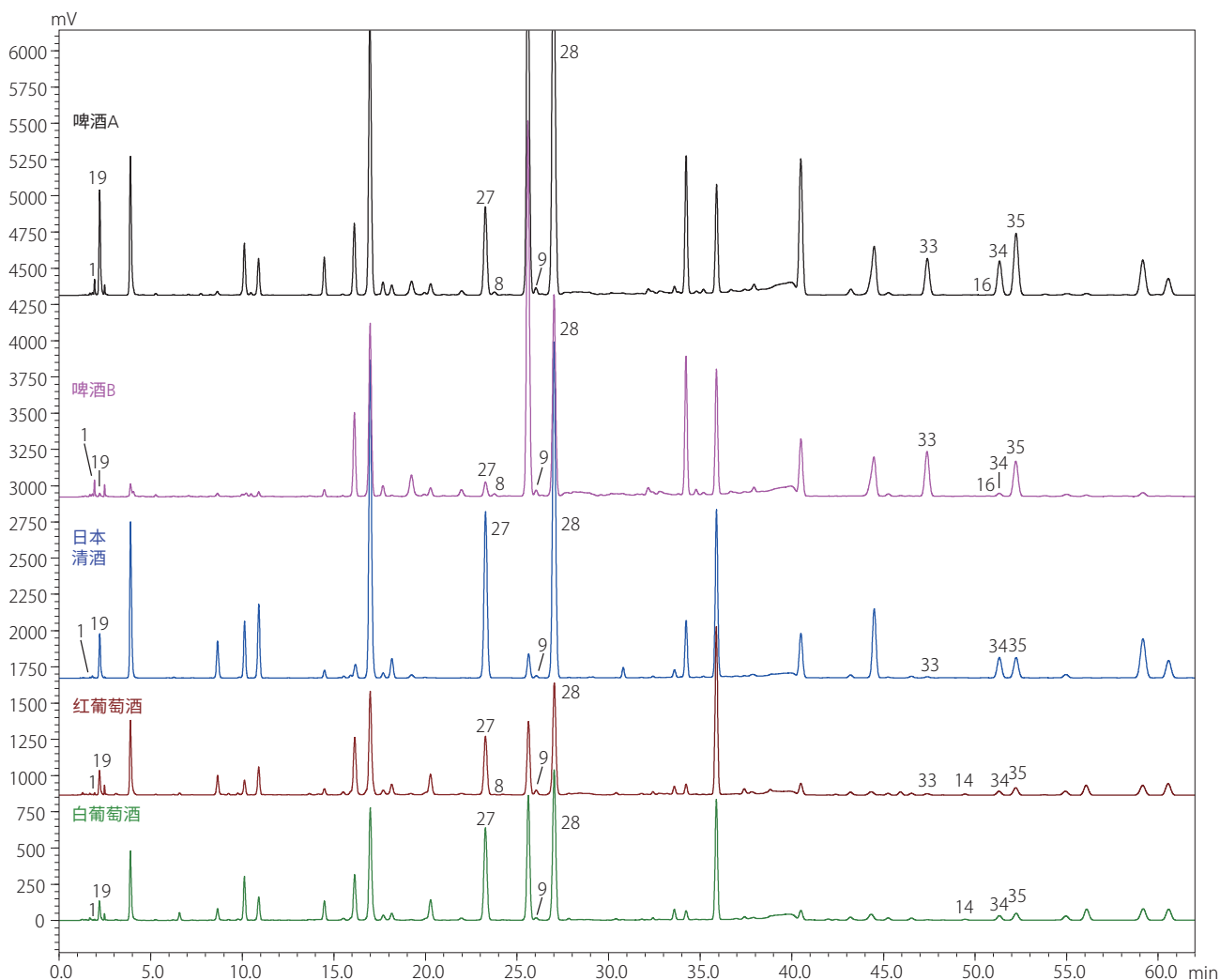


图 5 酒类的色谱图 (OPA/NAC 衍生化)

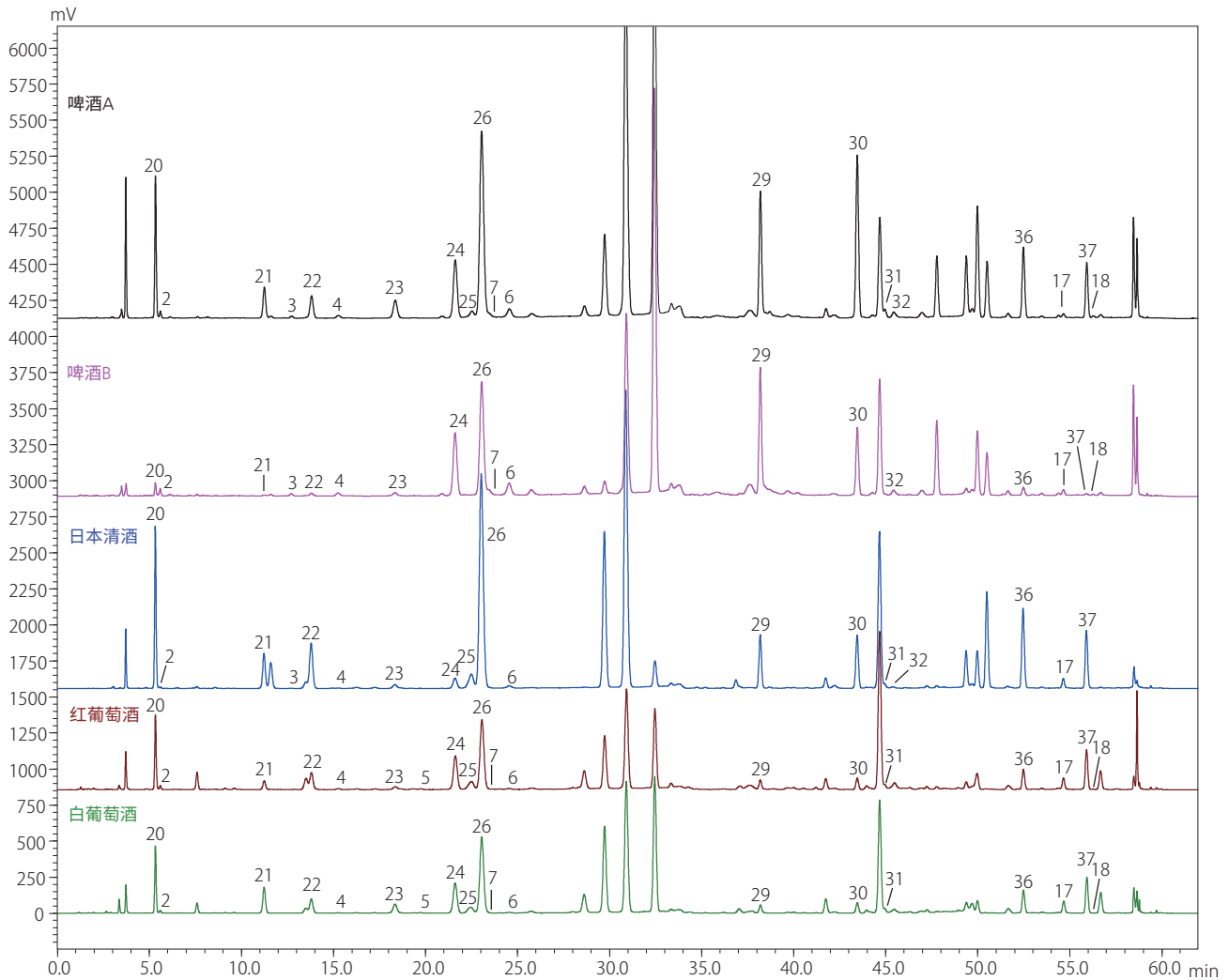


图 6 酒类的色谱图 (OPA/NIBC 衍生化)

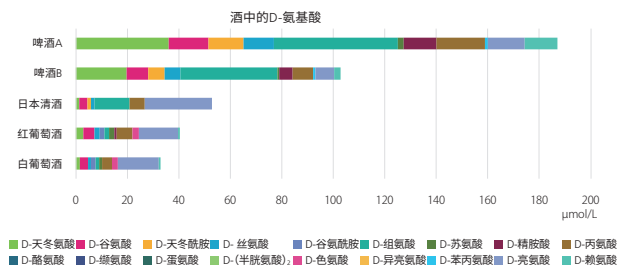
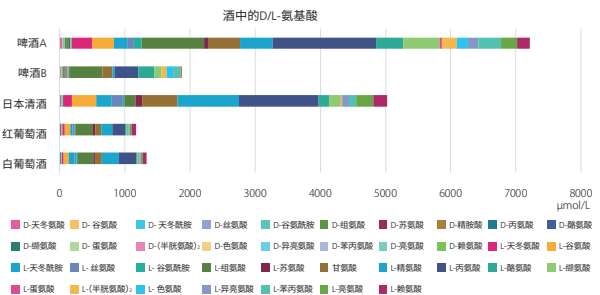


图 7 酒类中的 D- 氨基酸含量



※ 由于高浓度含有一部分L型, 因此具有定量范围以外的组分。

图 8 酒类中的 D/L- 氨基酸含量

总结

使用具有手性结构的衍生化试剂, 以反相模式分离非对映异构体形态的 37 种组分的 D/L- 氨基酸并进行了荧光检测。

使用送液泵的流动相混合功能和自动进样器的自动预处理功能实现了自动化。通过自动切换并执行两种分析条件, 可将流动相的制备、衍生化反应以及流动相更换所需的时间和人力共减少 1 小时以上 (分析 20 个样品)。同时, 能够使从衍生化到开始分析的时间保持恒定。

此外, 使用两种手性疏醇, 可以分离酒类中的 D/L- 氨基酸共 37 种组分。发现酒类中 D- 氨基酸的种类和含量在不同酒的种类中也不同。在啤酒中, D- 氨基酸的含量根据种类不同而相差约两倍。并且, 可以证实与 L 型相比, D 型是微量存在的。 **岛津应用云**

Nexera、LabSolutions、Shim-pack Scepter、SHIMADZU LabTotal 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。



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。