

## 氨基酸手性检测试剂盒

# DL-Amino Acid Labeling Kit

该产品是用于 HPLC 分析的氨基酸手性检测试剂盒。由于氨基酸具有高亲水性且紫外线吸收不足，因此需要在 HPLC 之前标记氨基酸。近年来，D- 氨基酸受到关注，但对于常规的标记试剂，例如异硫氰酸苯酯和丹酰氯，需要昂贵的手性柱来分离 D- 型和 L- 型。

使用该产品不仅可以轻松地完成复杂的标记，而且由于使用了 D-FDLDA，使用非手性色谱柱（例如 C<sub>18</sub>）也可实现手性分离。当然，它也可用于分析 L 型氨基酸地分析。

关键词：食品，代谢组学，氨基酸，多肽，蛋白质，HPLC，LC-MS，LC-MS / MS

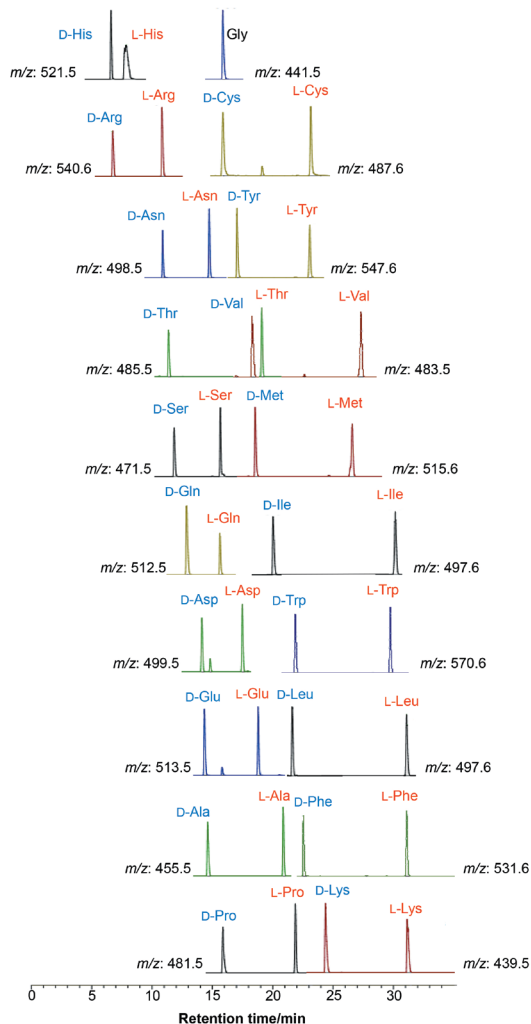
### 特 长

- 操作简单
- 不需要使用手性柱，用 C<sub>18</sub> 柱也可实现手性分离
- 与高灵敏度 MS 分析兼容
- 标记氨基酸稳定性高

### LC-MS 分析例

#### ■ 使用 LC-MS 分离各种 DL- 氨基酸(方法 1)

分离 19 种 DL- 氨基酸以及含有 Gly 的氨基酸时，可以分离所有的 D- 氨基酸和 L- 氨基酸。



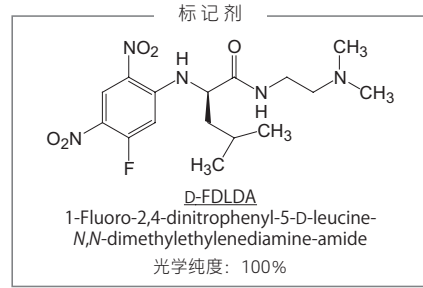
#### < 分析条件 >

Column: COSMOCORE 2.6C<sub>18</sub>  
2.1 mm I.D. × 100 mm  
Mobile phase:  
A: 0.1% Formic Acid - Acetonitrile / H<sub>2</sub>O = 10 / 90  
B: 0.1% Formic Acid - Acetonitrile / H<sub>2</sub>O = 50 / 50  
B conc. 0 → 10 → 60 → 100% (0 → 5 → 30 → 35 min)  
Flow rate: 0.4 mL/min  
Temperature: 40°C  
Detection: ESI(+)-MS

## 套装组成

### ■ 套装组成(100次测定用)(包括用户自己需要准备的物料)

	名称	容量	添加量 / 次
①	样品 *1	用户准备	100 μL
②	标记溶液 *2	10 mL	100 μL
③	反应开始溶液	10 mL	100 μL
④	去标签试剂(用于侧链) *3	10 mL	100 μL
⑤	反应停止液 *4	用户准备	100 μL
⑥	甲醇或乙腈	用户准备	500 μL or 600 μL



\*1 要反应的官能团总量应小于 1.0 μmol。如果更高, 则稀释或减少样品量。此外, 在标记(衍生化)时, 请把样品溶液调成中性。

\*2 使用 (D)FDLDA 作为标记试剂。

\*3 包含 6-mercapto-1-hexanol [M.W.: 134.24(C6H14OS)]。

\*4 反应停止液: 盐酸

## 2 种方法

本产品中使用的标记剂 D-FDLDA 与氨基反应。此外, 酪氨酸的酚羟基、半胱氨酸的硫醇基等一部分侧链也被标记。去除氨基酸侧链的标记剂(Lys 除外)见下图蓝框部分。

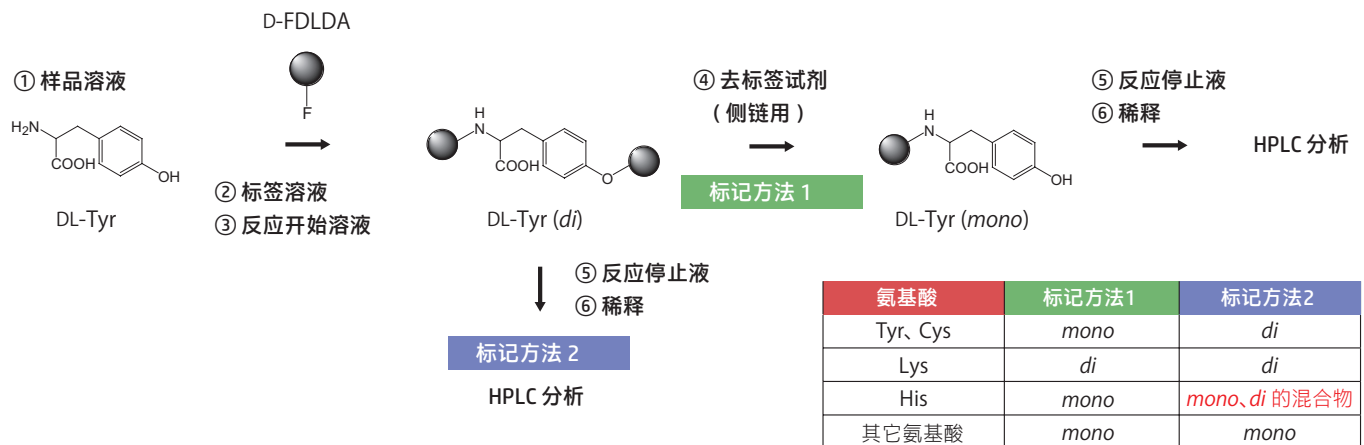


\*1 提前中和样品

\* 标记反应只需将试剂盒溶液加入样品溶液并加热即可。

\* 如果加入去标签试剂后没有颜色变化(黄色→深橙色), 说明样品浓度高, 可能有未被标记的氨基酸, 这时请稀释样品, 建进行标记反应。

### ■ DL-Tyr 中的标记机制



mono; 仅标记 α-碳的氨基  
di ; 除 α-碳外, 侧链上的官能团也被标记

如果样品中所含的氨基酸未知, 请尝试方法 1。

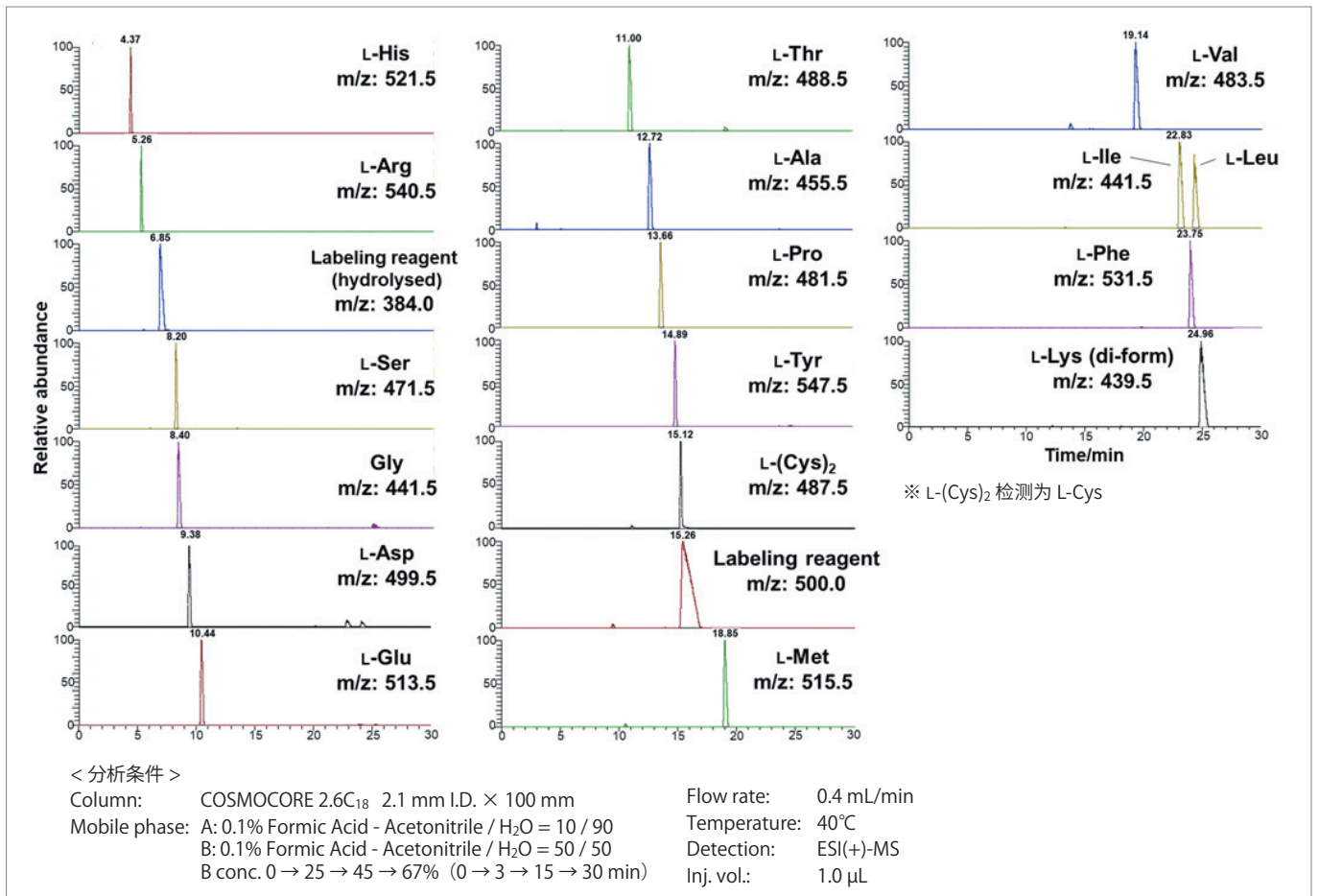
### 来自标记试剂的 HPLC 峰

名字	分子量	描述
D-FDLDA	385.39 (C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>5</sub> )	未反应的标记试剂(仅在方法2 中出现)
D-FDLDA (Hydrolysed)	383.40 (C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> )	标记试剂水解物
D-DLDA-S-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> OH	499.63 (C <sub>22</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S)	标记试剂和去标记试剂的反应产物(仅在方法 1 中出现)

强烈建议在分析样品之前先进行空白分析。

■ 分析氨基酸混合物

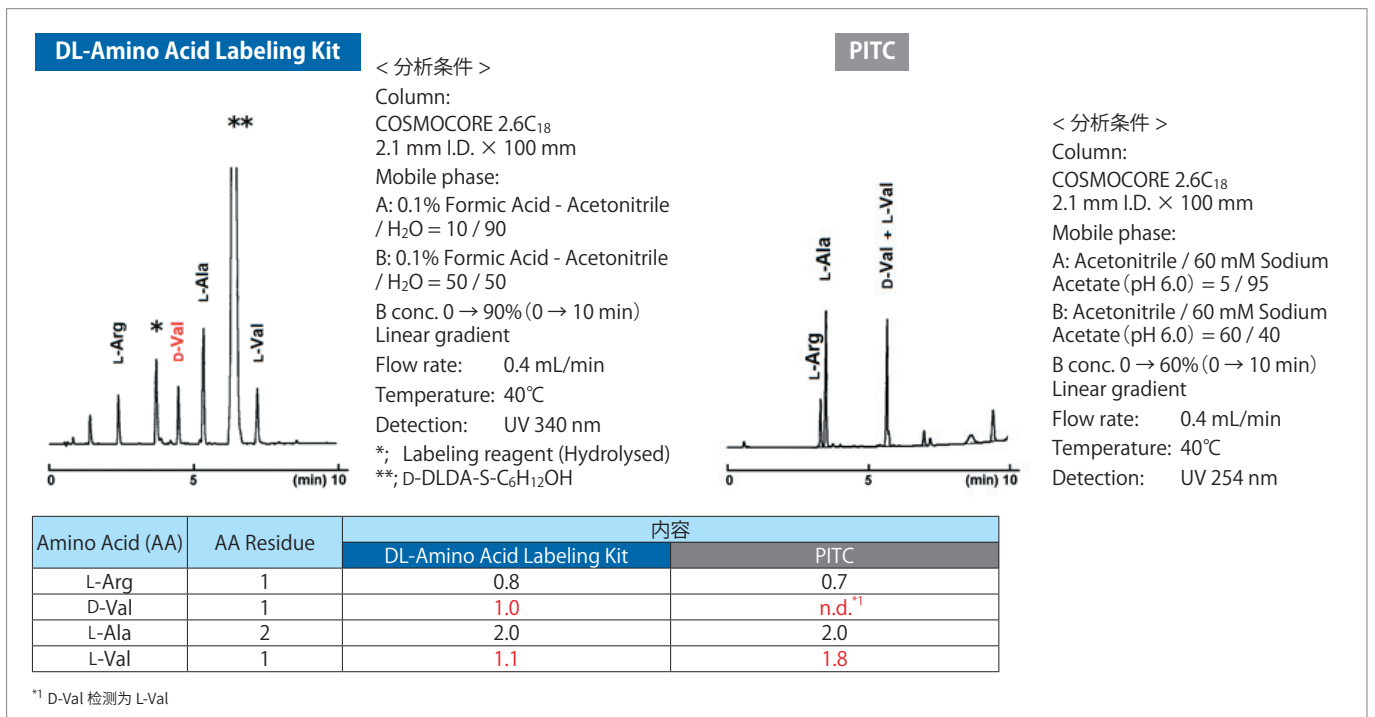
用氨基酸手性检测试剂盒标记肽水解后检测到的氨基酸，然后使用 LC-MS 分析。



■ 水解肽的氨基酸分析

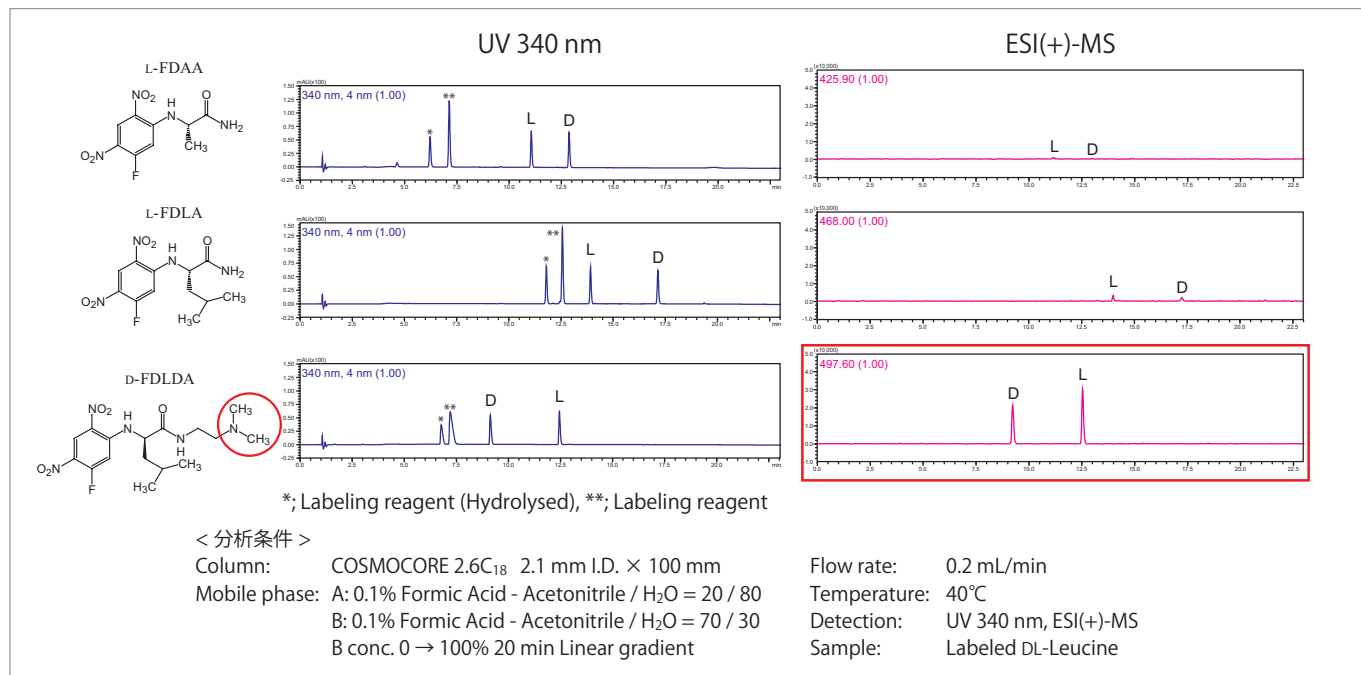
N 末端的 Val 为 L 型、中心的 Val 为 D 型的肽 (H-VRVAA-NH<sub>2</sub>: LLDLL-form) 在水解后, 用氨基酸手性检测试剂盒和异硫氰酸苯酯 (PITC) 对其进行标记。

用 PITC 标记时, D-Val 和 L-Val 的峰完全重叠, 无法识别外消旋化。而使用氨基酸手性检测试剂盒进行标记后, 因为可以光学分离氨基酸, 因此也可以用于确认合成肽有无外消旋化。



### ■ 与传统手性标记剂的比较

在通过非手性柱光学分离氨基酸中，基于 Marfey 方法，(L)FDAA 或 (L)FDLA 的标记剂是已知的，但是该产品的标记剂 (D)FDLDA 易于电离，因此与传统方法相比，MS 灵敏度更高，而 UV 灵敏度大致相同。由于使用了 D 型标记试剂，因此洗脱顺序与常规方法相反。



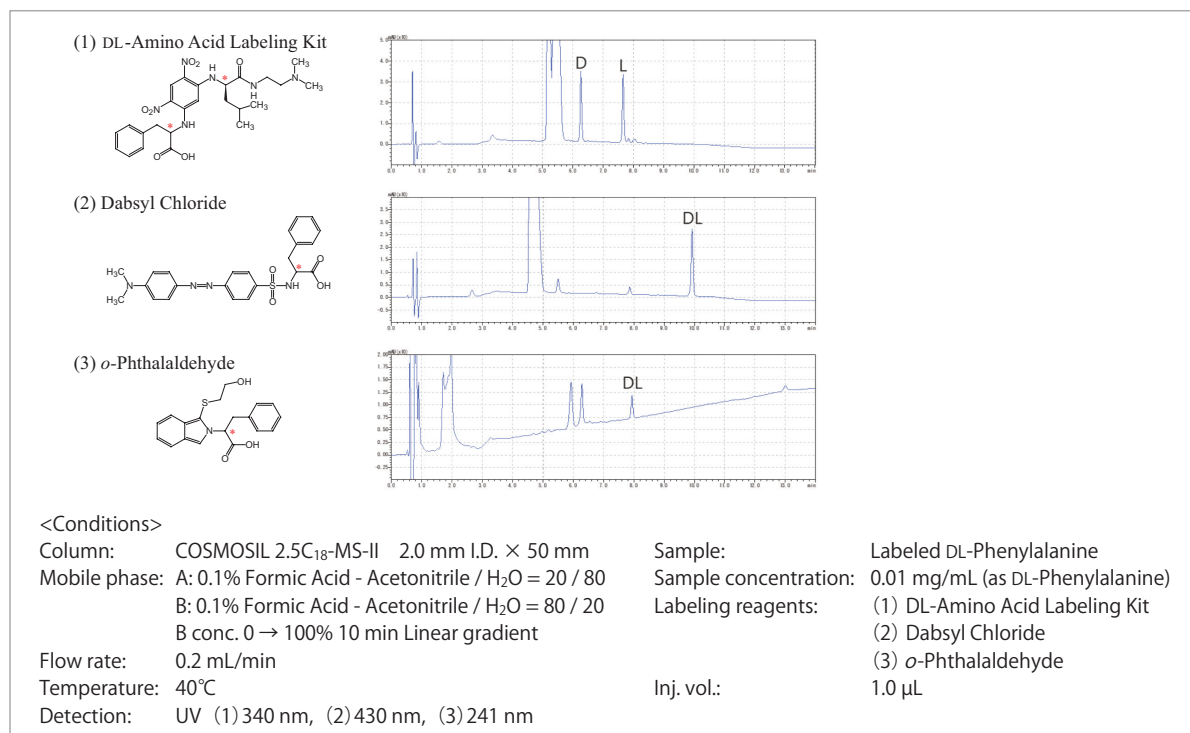
### ■ 与非手性标记剂的比较

使用以下四种标记试剂进行柱前标记法比较。

- (1) DL-Amino Acid Labeling Kit (#19942-74)
- (2) Dabsyl Chloride (#10427-91)
- (3) *o*-Phthalaldehyde (#27810-44)
- (4) 异硫氰酸苯酯 (PITC) \* 仅标记样品的稳定性数据

### ● 分离氨基酸 D 型和 L 型

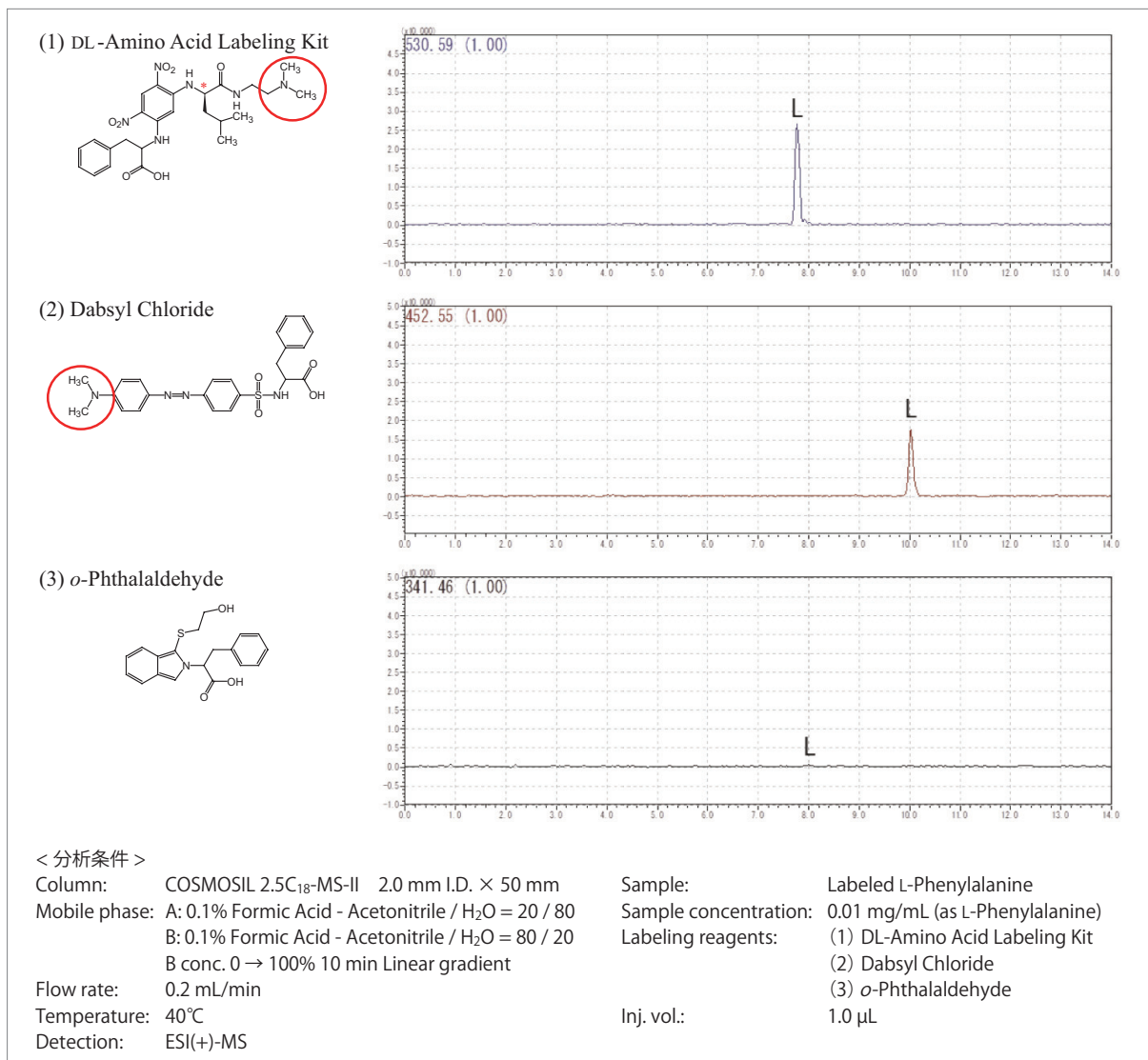
在 C<sub>18</sub> 柱上分析被标记的 DL- 苯丙氨酸，氨基酸的 DL 形式不能被非手性标记剂的 (2) 和 (3) 非手性标记剂分开，但 (1) DL- 氨基酸标记试剂盒因其标记试剂结构中有不对称碳原子，且氨基酸的 D 和 L 形是非对映异构体，因此能够分离。



※ (3) 邻苯二甲醛标记的氨基酸一般使用荧光检测器进行分析。

## ● 质谱仪(MS) 检出感度

我们比较了标记的 L-苯丙氨酸在质谱仪(MS) 检测时的灵敏度。DL-氨基酸手性检测试剂盒中的标记试剂和丹磺酰氯都是易于电离的结构, 因此在 MS 中的检测灵敏度很高。(4) 由 PITC 生产的 PTC 氨基酸的推荐流动相不能用于 MS。



## ● 标记样品稳定性

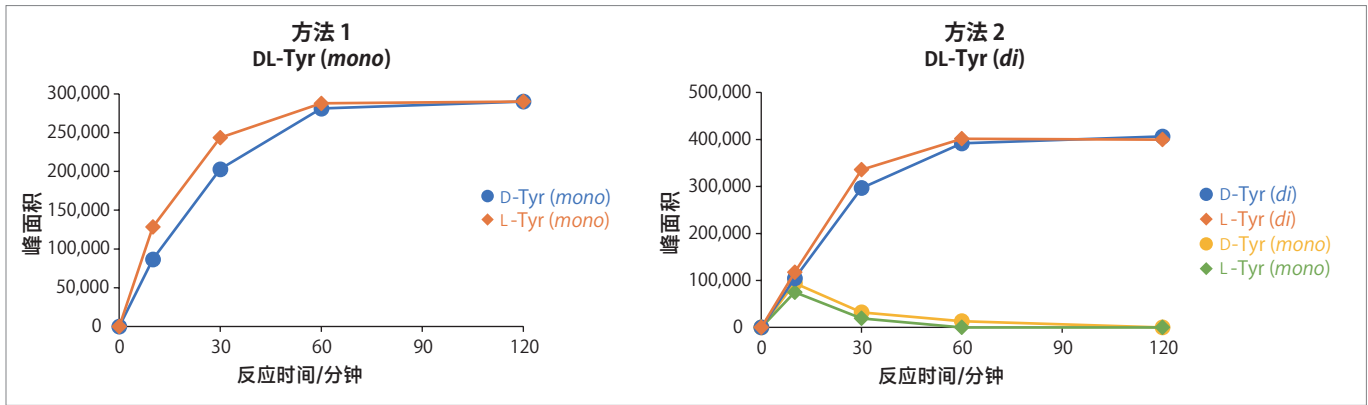
在反应日后第 1 天、3 天和 7 天通过 HPLC 分析标记的 L-苯丙氨酸。用邻苯二甲醛标记的样品稳定性较差, 不适合手动标记, 应仅限于分析仪的在线分析。PITC 标记的样品也不太稳定。

反应后 天数	(1) DL-Amino Acid Labeling Kit	(2) Dabsyl Chloride	(3) <i>o</i> -Phthalaldehyde	(4) PITC
1	100%	100%	100%	100%
3	113%	95%	0%	81%
7	106%	96%	0%	83%

※ 将反应后第一天的峰面积设为 100%。PITC 标记的样品冷冻保存, 其他样品冷藏保存

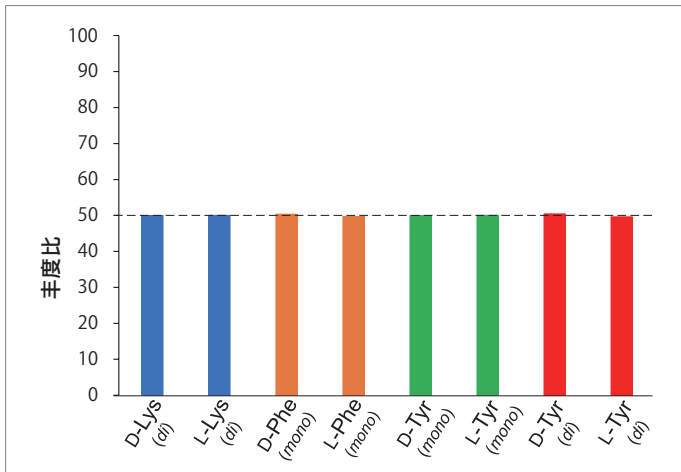
### ■ 氨基酸标记反应

DL-Tyr 根据标记方法不同，标记试剂结合数量不同。使用 DL-Tyr 测量标记反应随时间的变化，结果表明，氨基酸在开始 2 小时内被完全标记。



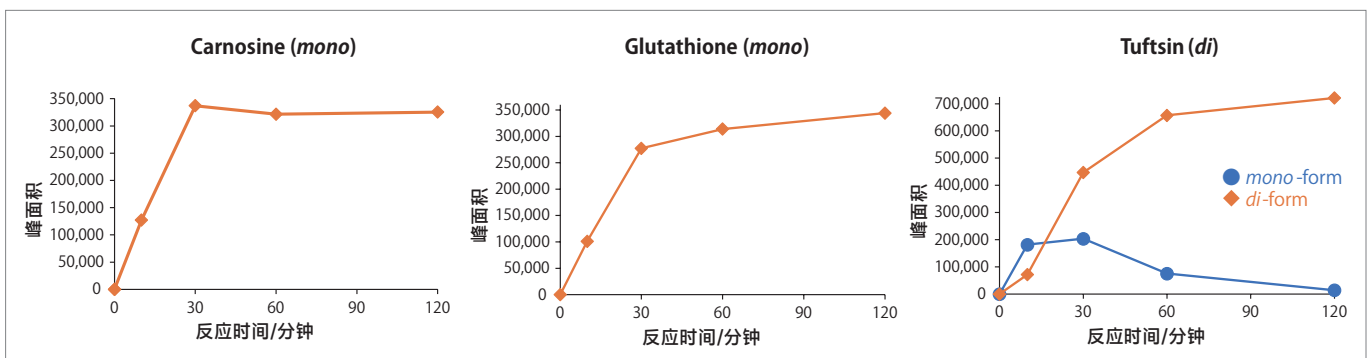
### ■ 标记的后 DL-氨基酸的 DL 体比率

标记 2 小时后，根据每个 DL-氨基酸的峰面积值计算 DL 体的比例，发现标记精确到 1:1。另外，确认单独反应的 D 型和 L 型氨基酸的光学纯度 (e.e) 时，所有氨基酸的光学纯度均为 100%。



### ■ 肽标记反应

不仅氨基酸，短链肽也可以与氨基酸用相同的方式进行标记，而不用管序列的长度或标记试剂的结合位点的数量。



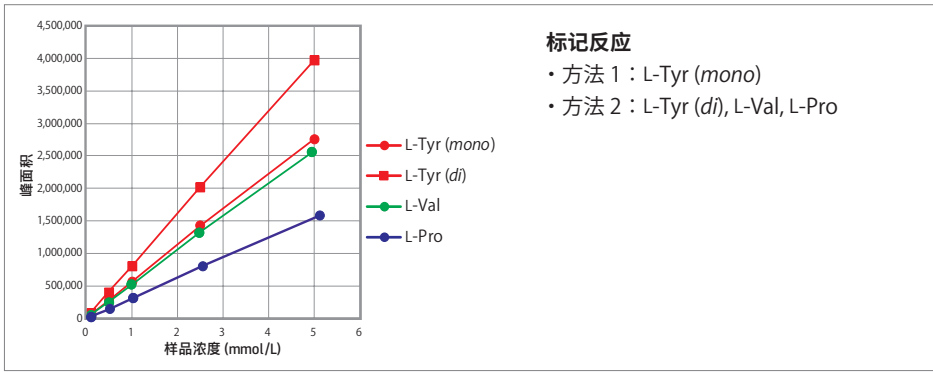
Peptides	Carnosine	Glutathione	Tuftsin
Sequence	H-βAla-His-OH <sup>*1</sup>	H-Glu-Cys-Gly-OH	H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH
Amino acid residues	2	3	4
Labeling reagent binding sites	1	1	2 <sup>*2</sup>

<sup>\*1</sup>βAla: β-丙氨酸 <sup>\*2</sup>两种标记剂与 Lys 赖氨酸侧链的氨基结合



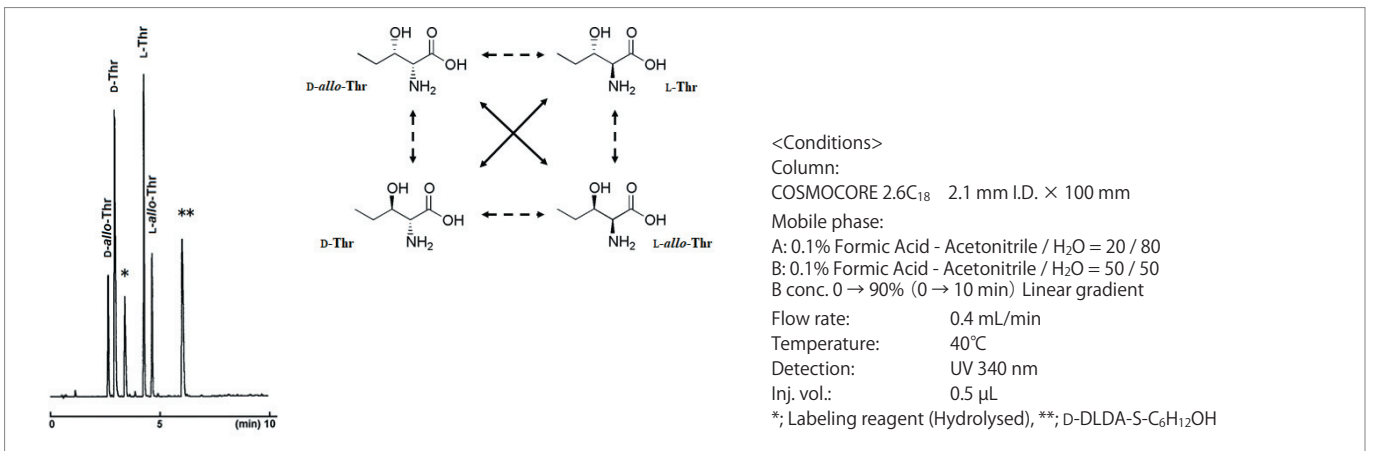
## 定量表现

用该试剂盒标记的不同浓度的氨基酸通过 HPLC 分析。校准曲线在测试浓度范围内显示出高度线性。

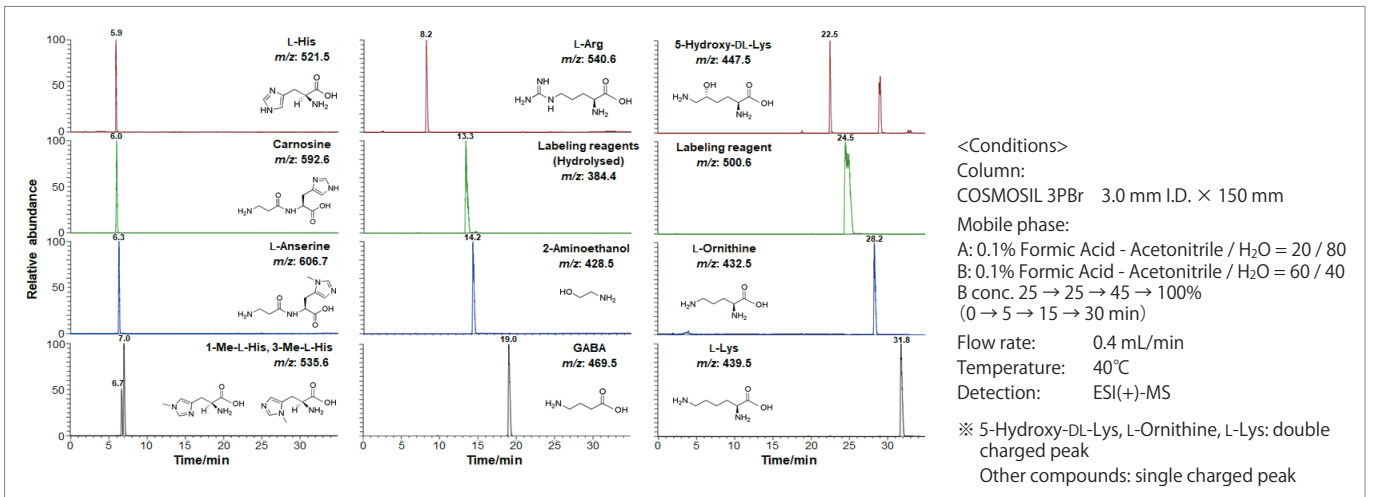


## 其它应用数据

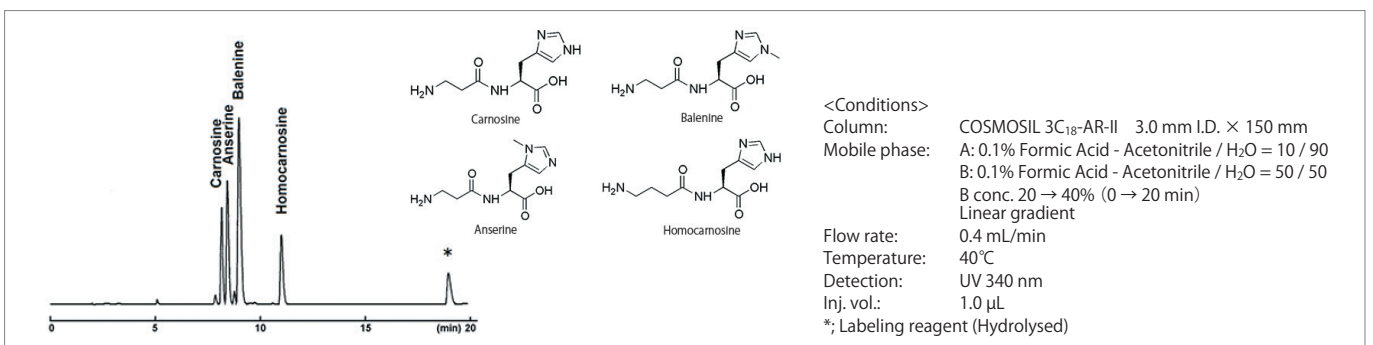
### 4 种 Thr 异构体的分离 (HPLC/ 方法 1)



### 同时分离 C<sub>18</sub> 色谱柱难以分离的碱性化合物 (LC-MS / 方法 1)

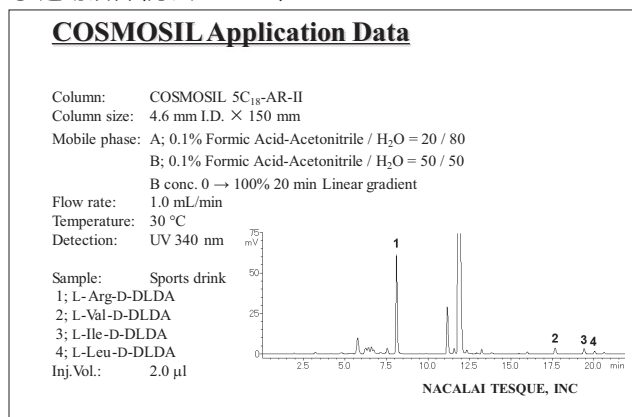


### 咪唑二肽的分离 (HPLC/ 方法 1)

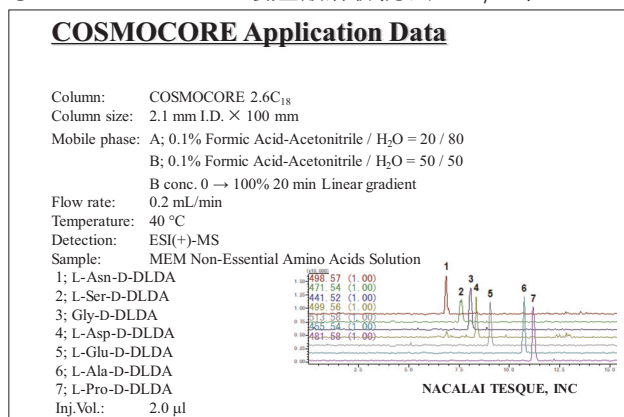


## 其他应用数据

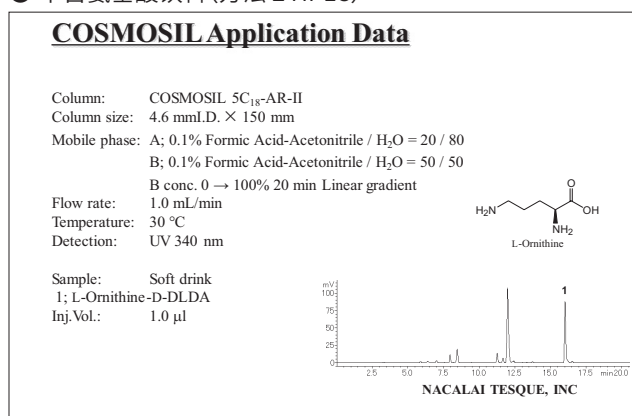
### ● 运动饮料(方法 2 HPLC)



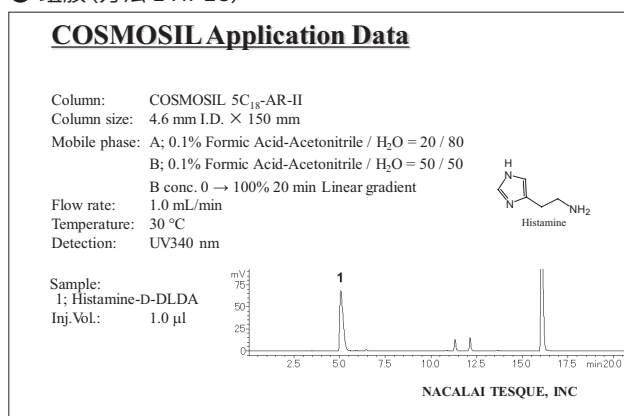
### ● MEM non-essential 氨基酸溶液(方法 1 LC/MS)



### ● 市售氨基酸饮料(方法 2 HPLC)



### ● 组胺(方法 1 HPLC)



除氨基酸外，该产品还可用于其他胺和硫醇化合物。

## 参考文献

### ● 标记剂 D-FDLDA 的说明(L-FDVDA, #20363-24)

Kuranaga, T.; Minote, M.; Morimoto, R.; Pan, C.; Ogawa, H.; Kakeya, H. Highly Sensitive Labeling Reagents for Scarce Natural Products. ACS Chem. Biol. 2020, 15(9), p. 2499-2506

<https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00517>

Kuranaga, T.; Kakeya, H.; Chapter Five - Development and application of highly sensitive labeling reagents for amino acids. Methods in Enzymol. 2022, 665, p. 105-133

<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2021.11.004>

### ● 肽中 DL 体的识别

Ozaki, M.; Kuwayama, T.; Hirose, T.; Hashimoto, A.; Kuranaga, T.; Kakeya, H. Separation and identification of the DL-forms of short-chain peptides using a new chiral resolution labeling reagent. Anal. Bioanal. Chem. 2022, 414, p. 4039-4046

<https://doi.org/10.1007/s00216-022-04048-w>

※ 有关标记(衍生)氨基酸分析的数据可在“补充信息”中找到。

## 订购信息

产品信息	规格	存储温度	货号	容量	价格
DL-Amino Acid Labeling Kit	SP	15-25° C	19942-74	100 tests	inquire

产品中包含的标记试剂已获得京都大学的专利。Nacalai Tesque, Inc. 经许可生产和销售该产品。

COSMOSIL / COSMOCORE 是 Nacalai Tesque, Inc. 的注册商标

For research use only, not intended for diagnostic or drug use.



NACALAI TESQUE, INC.  
 Nijo Karasuma, Nakagyo-ku, Kyoto 604-0855 JAPAN  
 TEL : +81-(0)75-251-1730  
 FAX : +81-(0)75-251-1763  
 Website : www.nacalai.com  
 E-mail : info.intl@nacalai.com



麦可旺志企业 中国代理商

麦可旺志(海南)科技有限公司  
 海南省海口市南海大道266号  
 免费电话:400-0810-128  
 网页:www.microwants.com  
 电子邮箱:info@microwants.com  
 苏州·北京·上海·沈阳·天津·济南·泰安  
 成都·武汉·西安·贵阳·昆明·楚雄·海口