

超高效液相色谱-串联质谱法直接测定啤酒中 20 种游离氨基酸含量

吴少明[#], 黄永辉[#], 陈言凯, 蔡小明^{*}, 冯丽凤, 林浩学, 陈何桑, 黄 燕, 叶梦薇, 梁 敏^{*}

(福建省产品质量检验研究院, 国家加工食品质量监督检验中心, 福州 350002)

摘 要: **目的** 采用超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS), 建立高效、快速直接测定啤酒中 20 种游离氨基酸的方法。**方法** 啤酒样品经水稀释后, 经 CAPCELL PAK CR 1:4 ST 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 5 μ m)分离, 乙腈-0.3%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 采用电喷雾离子源正离子模式, 在多反应监测模式下进行检测。**结果** 20 种游离氨基酸在各自相应线性范围内, 线性关系良好, 相关系数(r^2)均大于 0.99; 加标回收率为 81.3%~108.4%, 相对标准偏差在 2.5%~7.2%之间, 方法检出限为 1~6 ng/mL, 方法定量限在 3~15 ng/mL 之间。**结论** 该方法灵敏、准确, 具有良好的重复性和稳定性, 可快速检测出啤酒中的 20 种游离氨基酸成分。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 啤酒; 游离氨基酸

Direct determination of 20 kinds of free amino acids in beer by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WU Shao-Ming, HUANG Yong-Hui, CHEN Yan-Kai, CAI Xiao-Ming^{*}, FENG Li-Feng,
LIN Hao-Xue, CHEN He-Shen, HUANG Yan, YE Meng-Wei, LIANG Min^{*}

(Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, China National Quality Supervision and Testing Center for Processed Food, Fuzhou 350002, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the efficient, fast and direct determination of the 20 kinds of free amino acids in beer by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Beer samples were diluted with water, then separated on a CAPCELL PAK CR 1:4 ST chromatographic column (150 mm×2.1 mm, 5 μ m) with acetonitrile-0.3% formic acid in water with a gradient elution, multiple reaction monitoring mode was used for detection in electrospray ionization with positive ion mode. **Results** The linear relationships of the 20 kinds of free amino acids within their corresponding linear ranges were good, the correlation coefficient (r^2) were all greater than 0.99; the recoveries were between 81.3% and 108.4%, the relative

基金项目: 福建省市场监督管理局科技项目(FJMS2019009)

Fund: Supported by the Science and Technology Project of Fujian Administration for Market Regulation (FJMS2019009)

[#]吴少明、黄永辉为共同第一作者

[#]WU Shao-Ming and HUANG Yong-Hui are Co-first Authors

*通信作者: 蔡小明, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检测。E-mail: 289470015@qq.com

梁 敏, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检测。E-mail: 280257959@qq.com

*Corresponding author: CAI Xiao-Ming, Master, Engineer, Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350002, China. E-mail: 289470015@qq.com

LIANG Min, Master, Engineer, Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350002, China. E-mail: 280257959@qq.com

standard deviations were 2.5%–7.2%, the limits of detection were 1–6 ng/mL, and the limits of quantitation were 3–15 ng/mL. **Conclusion** The method is sensitive, accurate, has good repeatability and stability, and it can be used for quickly determination of the 20 kinds of free amino acids in beer.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; beer; free amino acids

0 引言

啤酒是以麦芽为原料,再添加适量啤酒花,通过酵母发酵而成的低度酒,营养丰富,被称为“液体面包”,对人们的健康和新陈代谢有积极的作用^[1]。啤酒的营养价值、香气和风味在很大程度上取决于其原料在发酵过程中蛋白质水解产生的游离氨基酸的丰富程度^[2-3], 氨基酸含量也是衡量啤酒营养价值的重要指标之一,在自然酿造条件下氨基酸含量越高其营养价值越高。此外,鉴别一种啤酒是原汁发酵还是加水勾兑而成的方法之一就是检测其游离氨基酸含量,另外,通过测定啤酒中氨基酸的组成,还可以区分啤酒的种类,因此建立啤酒中快速、准确的氨基酸分析方法是十分必要的。

目前,游离氨基酸的检测方法主要有氨基酸分析仪法^[4-7]、高效液相色谱法、气相色谱法、毛细管电泳法、离子交换色谱法、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS),其中,氨基酸分析仪法^[8-9]、液相色谱法^[10-13]、LC-MS/MS 法^[14-15]为主流方法^[8-15]。由于游离氨基酸具有强极性、难挥发性、缺乏紫外或荧光发光官能团等特点,很难直接进行测定,通常需要一个衍生化步骤,以提高分离度和检测的灵敏度,常见的衍生剂有邻苯二甲醛-9-苄甲基氯甲酸酯、丹酰氯和巯基乙醇等,通过衍生后再采用液相色谱进行测定^[16-18]。郑昕等^[19]、周伟^[20]采用邻苯二甲醛-9-苄甲基氯甲酸酯进行柱前衍生法测定啤酒中多种游离氨基酸的含量;李梅等^[21]采用 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚氨基甲酸酯作为衍生剂对啤酒中多种游离氨基酸进行测定。然而,衍生过程较为复杂,且存在衍生不完全、重现性差、杂质干扰大、制备时间长、灵敏度低、缺乏分析物特异性以及衍生剂毒性较大等问题^[22-26]。氨基酸分析仪法所用的试剂和缓冲溶液较为昂贵并且操作复杂、仪器运行时间长,试验效率较低。对于 LC-MS/MS 法,目前也大多是采用衍生后再进行测定,虽然大大降低了衍生后杂质带来的干扰、提高了灵敏度,但同样存在前处理过程复杂,衍生后重现性较差等弊端。因此,研究人员开始着手采用 LC-MS/MS 直接对游离氨基酸进行定性定量测定,消除衍生化带来的局限性,如 LIYANAARACHCHI 等^[16]以亲水相互作用液相色谱法(hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)进行

分离后,采用 LC-MS/MS 可实现对大米多种游离氨基酸成分进行直接测定。

近年来,越来越多的研究人员开始对啤酒中游离氨基酸的检测方法进行研究,而采用 LC-MS/MS 法直接测定啤酒中游离氨基酸含量的方法还未见有报道。因此,本研究拟采用超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)开发一种简单、快速、不需要衍生、灵敏度高的啤酒中 20 种游离氨基酸的直接测定法,为鉴定啤酒的真伪以及区分啤酒的种类提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LC-30AD 超高效液相色谱仪、Shimadzu 8050 三重四极杆-串联质谱仪(日本岛津公司); Aanti J-E 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); Milli-Q 超纯水纯化系统(美国 Millipore 公司); DS-8510 DTH 超声波振荡器(上海分析超声仪器有限公司); MS 3 basic 旋涡混匀器(美国 IKA 公司); BEH AMIDE 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、BEH HILIC 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.7 μm)(美国沃特斯公司); CAPCELL PAK CR 1:4 ST 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm)(日本资生堂公司)。

苯丙氨酸(Phe)、甲基组氨酸(Me-His)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、络氨酸(Tyr)、蛋氨酸(Met)、谷氨酸(Glu)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、精氨酸(Arg)、苏氨酸(Thr)、天冬酰胺(Asn)、肌肽(Car)、半胱氨酸(Cys)、羟赖氨酸(Hyd)、鸟氨酸(Orn)、脯氨酸(Pro)、色氨酸(Try)、天冬氨酸(Asp)、高胱氨酸(Hom) 20 种游离氨基酸混合标准溶液(0.5 μmol/mL, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 异亮氨酸(Ile, 纯度 98.0%)、亮氨酸(Leu, 纯度 99.9%)标准品(美国 Chroma DEX 公司); 甲酸、乙腈、甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 水为纯水机制备(电导率>18.2 mΩ)。

白啤 6 个、鲜啤 5 个、黑啤 4 个,均购于福州市超市。

1.2 标准曲线的配制

准确取适量液体标准品用 0.1 mol/L HCl 溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,配制成约 1.0 mg/mL 的储备液。分别移取适量的游离氨基酸混合标准储备液于 10 mL 容量瓶中,用 20%甲醇水稀释成 6 个系列质量浓度水平(见表 1)的标准系列工作曲线溶液,上机测试。

表 1 20 种游离氨基酸标准系列质量浓度
Table 1 Standard series mass concentrations of the 20 kinds of amino acids

游离氨基酸	标准系列质量浓度/(ng/mL)				
	S1	S2	S3	S4	S5
Phe	10.30	20.6	41.2	103	207
His	10.60	21.2	42.4	106	212
Me-His	9.70	19.4	38.8	97.0	194
Lys	9.15	18.3	36.6	91.4	183
Tyr	11.30	22.6	45.2	113	227
Met	9.30	18.6	37.2	93.3	187
Glu	9.20	18.4	36.8	91.9	184
Ile	8.20	16.4	32.8	81.9	164
Leu	8.20	16.4	32.8	82.0	164
Arg	10.90	21.8	43.6	109	218
Thr	7.45	14.9	29.8	74.4	149
Ans	15.00	30.0	60.0	150	300
Car	14.20	28.3	56.6	141	283
Cys	15.00	30.0	60.0	150	300
Hyd	10.20	20.3	40.6	101	203
Orn	8.26	16.5	33.0	82.6	165
Pro	7.20	14.4	28.8	71.9	144
Try	12.80	25.6	51.2	128	255
Asp	8.35	16.7	33.4	83.2	166
Hom	16.80	33.6	67.2	168	336

1.3 样品前处理方法

准确取 1.00 mL 啤酒样品于 5 mL 玻璃试管中, 加入超纯水至 5 mL 刻度, 涡旋混匀后, 分取 1.0 mL 至 10 mL 刻度管中, 加入超纯水稀释并定容至刻度, 涡旋混匀后过 0.22 μm 滤膜后上机测试, 若含量太高则再适当稀释至合适浓度。

1.4 质谱色谱条件

质谱条件: 电喷雾离子源正离子模式; 多反应监测模式; 加热器温度: 400 ℃; 加热气流速: 10.0 L/min; 接口电压: 3000 V; 雾化器流速: 3.0 L/min; 干燥器流速: 10.0 L/min; 脱溶剂温度: 600 ℃; 定性离子、定量离子及其他质谱参数见表 2。

表 2 20 种游离氨基酸质谱参数
Table 2 MS parameters for the 20 kinds of free amino acids

化合物	离子对(<i>m/z</i>)	四级杆 1 电压/V	碰撞电压/V	四级杆 3 电压/V
Phe	166.1/120.2*	10	25	30
	166.1/103.2	11	45	24
Me-His	170.1/124.2*	11	28	30
	170.1/96.1	11	45	21
His	156.1/110.2*	10	28	29
	156.1/93.1	21	35	26
Lys	147.1/84.2*	19	29	23
	147.1/130.2	19	19	20

表 2(续)

化合物	离子对(<i>m/z</i>)	四级杆 1 电压/V	碰撞电压 /V	四级杆 3 电压/V
Tyr	182.1/136.2*	12	28	11
	182.1/165.1	11	19	22
Met	150.1/133.1*	10	18	21
	150.1/104.2	10	21	29
Glu	148.1/84.1*	10	30	24
	148.1/102.1	20	22	30
Ile	132.1/86.2*	18	20	27
	132.1/68.1	18	28	23
Leu	132.1/86.2*	18	18	29
	132.1/68.1	18	37	15
Arg	175.1/70.1*	11	41	17
	175.1/60.2	22	29	18
Thr	120.2/56.2*	14	29	15
	120.2/74.2	22	16	24
Ans	241.1/109.2*	14	48	29
Car	227.2/110.2*	14	48	30
Cys	241.1/109.2*	15	47	28
Hyd	163.1/82.1*	23	29	24
	163.1/128.1	22	24	28
Orn	133.2/70.1*	12	31	17
	133.2/116.1	19	16	19
Pro	116.1/70.1*	16	28	19
Trp	205.3/146*	16	16	25
	205.3/188.3	13	11	13
Asp	134.2/88.3*	10	12	17
	134.2/70.3	10	19	13
Hom	269.3/134.1*	10	19	13
	269.3/90.2	10	19	13

注: *为定量离子对。

液相色谱条件: 色谱柱: CAPCELL PAK CR 1:4 ST (150 mm×2.0 mm, 5 μm); 柱温: 45 ℃; 进样量: 2.0 μL; 流速: 0.4 mL/min; 流动相: 0.3%甲酸水(A)和乙腈(B), 梯度洗脱, 优化后的梯度洗脱为: 0~6.00 min, 80%~20% B; 6.00~8.00 min, 20% B; 8.00~8.01 min, 20%~80% B; 8.01~12.00 min, 80% B。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

分别取适量储备液以 50%乙腈稀释成质量浓度约为 1~5 μg/mL 的混合标准使用液上机测试。采用电喷雾离子源正离子模式先进行母离子扫描, 得到每个化合物的母离子[M+H]⁺, 进一步进行碎片离子扫描, 得到每个化合物的最优的碎片离子, 再将得到的母离子和碎片离子输入到软

件中,采用多反应监测模式进行仪器自动优化各化合物的预四级杆 1 电压、碰撞电压和四级杆 3 电压,定量和定性离子(见表 2),结果与吴少明等^[27]的报道一致。

2.2 液相条件的优化

2.2.1 色谱柱的选择

由于大部分游离氨基酸都属于亲水性化合物,具有较强的极性,一般采用的是亲水性的 HILIC 色谱柱,本研究对比了 BEH AMIDE 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、CAPCELL PAK CR 1:4 ST 色谱柱(150 mm×2.0 mm, 5 μm)和 BEH HILIC 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 3 种不同亲水性色谱柱。结果显示, BEH AMIDE 色谱柱对大多数游离氨基酸保留效果较差,尤其是 Phe 和 His 保留时间小于 1 min;而 BEH HILIC 色谱柱和 CAPCELL PAK CR 1:4 ST 色谱柱对 20 种目标物的保留能力较好,但 BEH HILIC 色谱柱无法分离 Ile 和 Leu 这对同分异构体,而 CAPCELL PAK CR 1:4 ST 色谱柱能实现 Ile 和 Leu 基线分离,因此选择 CAPCELL PAK CR 1:4 ST 色谱柱(150 mm×2.0 mm, 5 μm)作为分析柱。

2.2.2 流动相的选择

本研究先对比了甲醇和乙腈作为有机相的影响,结果发现,采用乙腈作为有机相时,目标物的响应、分离度和峰形均优于甲醇。由于化合物均采用电喷雾正离子扫描模式,在流动相中加入甲酸会具有增强离子化从而增强目标物响应的作用,于是本研究考查了水相中加入不同浓度甲酸(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%)对结果的影响。结果

显示,甲酸浓度从 0.1%增加至 0.3%,目标物的峰面积随之增大,当甲酸浓度达到 0.4%时,化合物的峰面积并未继续增大,而基线却明显升高。因此,选择 0.3%甲酸水/乙腈作为流动相,20 种游离氨基酸化合物总流离子色谱图见图 1。

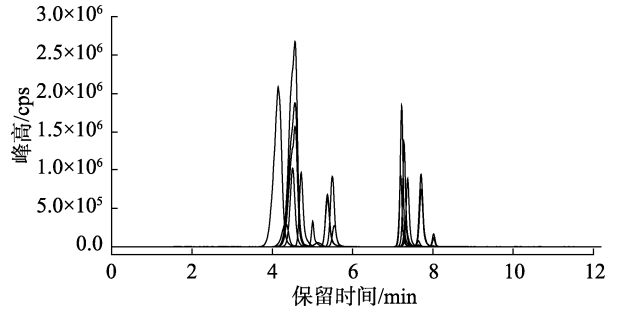


图 1 20 种游离氨基酸化合物的总流离子色谱图
Fig.1 Total ion chromatogram of the 20 kinds of amino acids

2.3 方法学验证

2.3.1 线性范围、检出限和定量限

以 20 种游离氨基酸的峰面积作为 Y 轴,质量浓度(ng/mL)作为 X 轴绘制标准曲线,并得到线性回归方程。线性回归方程、检出限(limits of detection, LODs, S/N=3)和定量限(limits of quantitation, LOQs, S/N=10)见表 3。从表中可以看出,在各自质量浓度范围内,20 种游离氨基酸物质线性关系较好,相关系数(r^2)在 0.99 以上,检出限在 1~6 ng/mL 之间,定量限在 3~15 ng/mL 之间。

表 3 20 种游离氨基酸回归方程、线性范围、相关系数(r^2)、检出限和定量限
Table 3 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients (r^2), LODs and LOQs of the 20 kinds of free amino acids

化合物	回归方程	线性范围	相关系数(r^2)	检出限/(ng/mL)	定量限/(ng/mL)
Phe	$Y=18392X-278521$	10.3~206.5	0.998	3	8
Me-His	$Y=5232.70X-32786.7$	10.6~211.2	0.999	5	15
His	$Y=6309.94X+27009.7$	9.70~194.0	0.991	5	15
Lys	$Y=6445.27X+12386.1$	9.15~182.8	0.999	4	12
Tyr	$Y=754.956X-193.389$	11.3~226.5	0.995	4	11
Met	$Y=6460.33X+158910$	9.30~186.5	0.998	3	10
Glu	$Y=6192.36X+59097.2$	9.20~183.9	0.997	2	5
Ile	$Y=13298.7X+115109$	8.20~163.9	0.999	5	15
Leu	$Y=21761.4X+416276$	8.20~164.0	0.998	4	12
Arg	$Y=11308.9X-70483.7$	10.9~217.8	0.999	2	6
Thr	$Y=5161.57X+64559.6$	7.45~148.9	0.995	6	16
Ans	$Y=510.376X-6312.25$	15.0~300.4	0.996	4	12
Car	$Y=490.877X-1656.93$	14.2~282.8	0.999	2	6
Cys	$Y=418.994X-8412.59$	15.0~300.4	0.992	5	15
Hyd	$Y=1242.74X+6227.36$	10.2~202.8	0.993	4	12
Orn	$Y=6031.07X+29379.5$	8.26~165.2	0.991	4	12
Pro	$Y=1577.41X+282831$	7.20~143.9	0.999	3	10
Trp	$Y=1532.6X-52433.9$	12.8~255.2	0.998	4	12
Asp	$Y=2997.45X+76488.1$	8.35~166.4	0.999	1	3
Hom	$Y=710.685X-17965.1$	16.8~335.5	0.998	3	10

2.3.2 准确度与精密度

以白啤酒为基质, 进行 3 水平 6 平行的加标回收试验, 20 种游离氨基酸 3 种不同加标水平的平均回收率在 81.3%~108.4% 之间, 相对标准偏差 (relative standard deviations, RSDs) 在 2.5%~7.2% 之间, 详细结果如表 4 所示, 表明该方法满足分析要求, 适用于啤酒中游离氨基酸物质的定量分析。

2.3.3 基质效应

本研究通过测定游离氨基酸在白啤、鲜啤、黑啤 3 种基质匹配混合标准溶液和试剂混合标准溶液中的峰面积按

照公式(1)式计算基质效应(matrix effect, ME)^[27]。

ME/%=(基质匹配标准溶液峰面积/试剂标准溶液峰面积-1)×100%

(1)

ME 为负值时, 表示有基质抑制效应, ME 为正值时, 表示存在基质增强效应, ME 在±20%以内表示基质效应不明显, 由图 2 可知, 3 种啤酒的基质效应规律一致, Arg、Ans、Car、Cys、Orn、Trp、Thea 7 种游离氨基酸表现为基质抑制, ME 在-14.4%~-2.7%之间, 其余 14 种游离氨基酸表现为基质增强, ME 在 0.6%~14.2%之间, 都在±20%以内, 说明在 3 种不同啤酒中本方法基质效应不明显。

表 4 游离氨基酸在啤酒样品种的加标回收率以及相对标准偏差(n=6)
Table 4 Spiked recoveries and RSDs of amino acids in the beer sample (n=6)

化合物	本底值/(ng/mL)	加标量/(ng/mL)	测定值/(ng/mL)	回收率/%	RSDs/%
Phe	8.00	10.30	18.6	102.5	4.2
		20.60	30.0	106.9	3.5
		41.30	48.7	98.5	5.1
		10.60	11.5	108.1	5.9
Me-His	ND	21.20	21.3	100.6	6.3
		42.30	44.8	105.9	7.2
		9.70	26.8	95.6	5.4
His	17.5	19.40	35.3	91.5	3.8
		38.80	56.9	101.6	4.2
		9.15	16.1	102.5	5.9
Lys	6.70	18.30	24.7	98.6	6.2
		36.60	44.5	103.3	4.4
		11.30	23.6	108.4	3.9
Tyr	11.4	22.70	35.0	103.9	5.1
		45.30	57.9	102.7	4.8
		9.32	12.8	100.5	6.3
Met	3.40	18.70	21.9	98.7	5.1
		37.30	42.0	103.5	4.4
		9.20	41.7	106.8	3.8
Glu	31.9	18.40	51.0	103.9	2.5
		36.80	69.0	100.9	5.8
		8.20	8.5	103.2	6.4
Ile	ND	16.40	16.4	99.8	4.7
		32.80	34.6	105.4	3.6
		8.20	8.3	101.6	4.5
Leu	ND	18.40	19.2	104.3	6.1
		32.80	34.3	104.6	3.8
		10.90	22.1	88.9	4.9
Arg	12.4	21.80	31.5	87.4	5.8
		43.60	49.9	85.9	3.7
		7.44	13.0	98.7	5.2
Thr	5.70	14.90	19.5	92.5	4.9
		29.80	37.2	105.6	6.8

表 4(续)

化合物	本底值/(ng/mL)	加标量/(ng/mL)	测定值/(ng/mL)	回收率/%	RSDs/%
Ans	ND	15.0	13.1	87.5	5.7
		30.0	24.4	81.3	3.6
		60.1	50.0	83.2	4.7
Car	ND	14.1	12.4	87.9	5.4
		28.3	24.6	86.9	3.6
		56.6	47.8	84.5	5.5
Cys	ND	15.0	13.6	90.5	4.4
		30.0	26.3	87.6	6.7
		60.1	57.3	95.3	2.8
Hyd	ND	10.1	10.1	100.2	3.8
		20.3	20.3	100	4.7
		40.6	40.7	100.2	5.8
Orn	7.90	8.26	15.4	90.5	5.2
		16.5	23.0	91.3	3.7
		33.1	39.1	94.3	4.9
Pro	10.7	7.20	18.2	104.2	6.5
		14.4	25.4	101.9	4.8
		28.8	39.7	100.7	5.2
Trp	8.30	12.8	19.8	89.9	4.7
		25.5	31.0	89.2	5.2
		51.1	53.5	88.4	3.5
Asp	11.8	8.32	19.2	88.9	6.8
		16.6	26.5	88.3	4.8
		33.3	41.6	89.5	3.4
Hom	ND	16.8	16.3	96.9	4.4
		33.6	32.9	98.0	3.6
		67.1	65.8	98.1	5.1

注: ND 表示小于检出限。

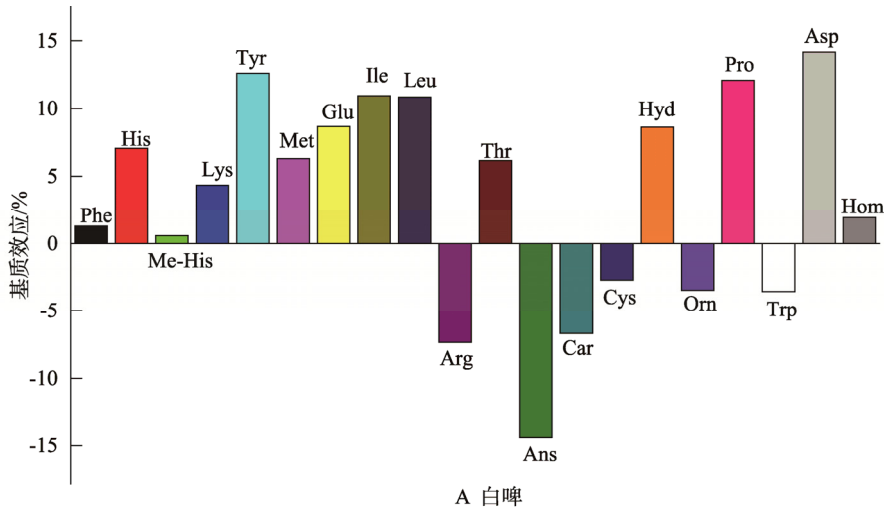


图 2 白啤、鲜啤、黑啤的基质效应
Fig.2 Matrix effects of white beer, fresh beer and black beer

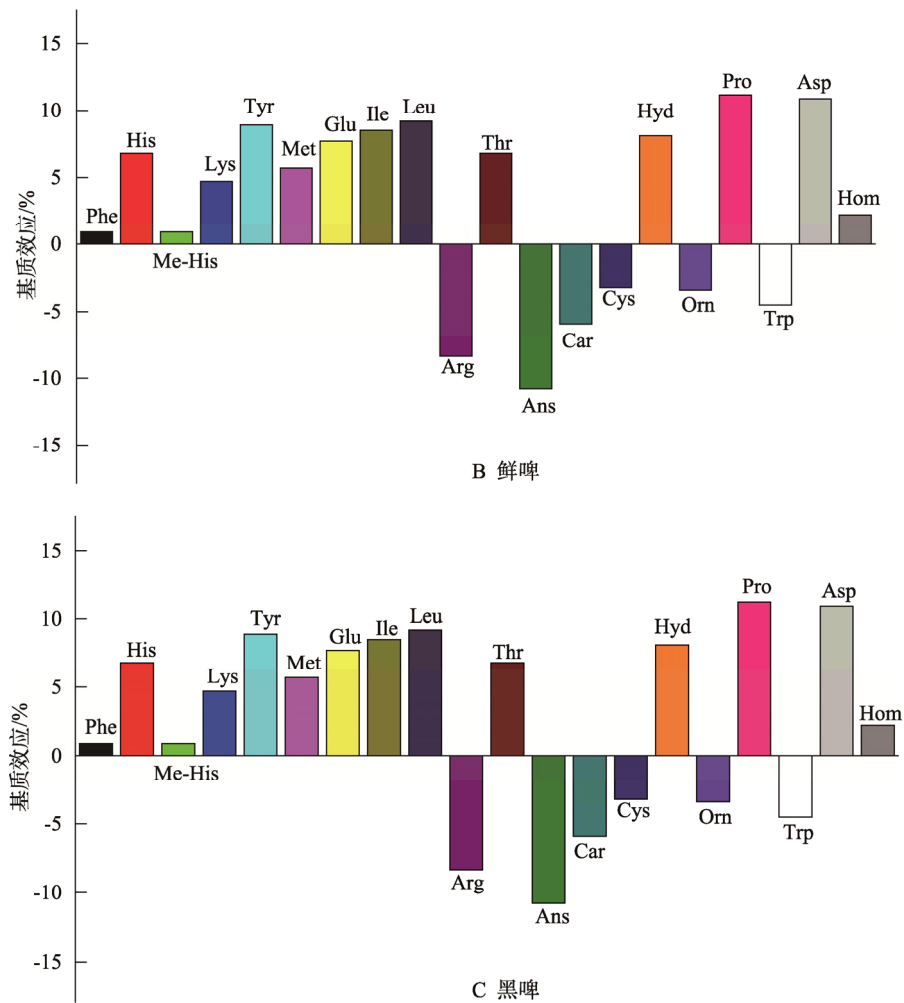


图 2(续) 白啤、鲜啤、黑啤的基质效应
Fig.2 Matrix effects of white beer, fresh beer and black beer

2.4 实际样品测定

实验选取了市场上常见品牌的啤酒共计 15 个样本进行实验, 包括白啤 6 个、鲜啤 5 个、黑啤 4 个。不同类型啤酒的游离氨基酸含量以及组成差异较大(见表 5), 总量较高的啤酒为黑啤, 分别在 414.4~533.7 ng/mL 之间, 均值

为 475.6 ng/mL; 总量居中的为鲜啤, 分别在 264.4~397.5 ng/mL 之间, 均值为 311.2 ng/mL; 最低的为白啤, 分别在 98.7~254.4 ng/mL 之间, 均值为 167.0 ng/mL; 但同一类型的啤酒, 麦芽度以及酒精度并不会影响游离氨基酸的组成及总量。

表 5 不同种类啤酒样品中 20 种游离氨基酸含量
Table 5 Content of 20 kinds of amino acids in different brands beer samples

项目	白啤 1	白啤 2	白啤 3	白啤 4	白啤 5	白啤 6	鲜啤 1	鲜啤 2	鲜啤 3	鲜啤 4	鲜啤 5	黑啤 1	黑啤 2	黑啤 3	黑啤 4
麦芽度	9	10.1	10	11	9	9	11	8	9.6	11	11	10	11	11.4	8
酒精度	3.6	4	4.1	4	3.6	3.6	4.1	3.2	3.3	4	4.3	4	4.3	5	2.5
Phe	ND	6.9	2.8	3.0	5.4	15.2	4.1	6.0	4.2	3.4	23.3	1.6	1.2	6.4	14.7
Me-His	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
His	3.6	6.4	6.8	6.6	9.4	8.0	12.7	6.6	12.9	6.7	19.7	5.4	4.6	5.5	11.9
Lys	3.1	6.7	11.8	6.3	7.4	7.9	20.9	6.1	1.1	6.6	22.0	5.3	3.5	13.9	37.4
Tyr	56.1	11.4	19.2	13.0	48.9	10.4	14.6	100.3	31.1	95.9	6.3	67.5	123.7	70.3	14.8

表 5(续)

项目	白啤 1	白啤 2	白啤 3	白啤 4	白啤 5	白啤 6	鲜啤 1	鲜啤 2	鲜啤 3	鲜啤 4	鲜啤 5	黑啤 1	黑啤 2	黑啤 3	黑啤 4
Met	5.6	3.4	4.7	1.1	3.7	1.5	5.2	1.8	2.1	4.4	2.4	5.5	6.2	0.3	3.5
Glu	1.4	15.3	12.3	11.8	15.7	6.0	19.6	18.5	34.8	18.4	79.1	13.3	4.8	26.6	21.8
Ile	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Leu	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Arg	1.7	8.2	14.3	7.8	9.4	19.0	20.3	9.1	25.1	7.9	26.7	3.1	2.9	15.2	14.5
Thr	0.7	2.4	0.9	6.1	5.9	5.1	2.3	4.5	1.6	7.5	11.1	1.5	6.5	3.0	10.4
Ans	ND	ND	ND	6.0	10.2	6.0	13.8	5.0	14.1	13.4	9.9	38.7	39.8	ND	11.8
Car	ND	ND	ND	24.5	36.6	29.7	48.8	18.3	52.3	51.0	35.7	140.0	143.1	ND	43.6
Cys	ND	ND	ND	15.2	26.9	21.5	34.4	13.3	35.7	33.8	24.1	97.0	101.3	ND	29.8
Hyd	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Orn	22.4	31.6	22.4	21.0	26.5	18.8	31.9	23.5	33.4	21.6	35.6	22.3	22.8	20.9	19.8
Pro	4.2	14.0	14.5	11.7	35.4	92.1	18.4	57.5	29.0	27.1	63.5	11.8	10.5	298.2	271.9
Trp	ND	7.9	3.9	5.8	0.8	ND	5.2	7.3	1.8	2.5	13.9	1.5	0.6	4.6	12.0
Asp	ND	6.3	12.1	10.8	10.1	13.0	12.2	6.5	10.9	19.3	24.4	ND	ND	18.3	15.9
Hom	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	98.7	120.4	125.8	150.8	252.1	254.4	264.4	284.3	290.3	319.7	397.5	414.4	471.4	483.2	533.7

注: ND 为未检出。

3 结 论

本研究通过对质谱、色谱条件和前处理方法的优化,建立了UPLC-MS/MS直接测定啤酒中20种游离氨基酸的方法。与常规的游离氨基酸自动分析仪法和液相色谱法相比,该方法操作简单,不需要进行衍生化处理,分析时间短。同时该法还具有较高的灵敏度和准确性,具有良好的重复性和稳定性,适用于啤酒中20种游离氨基酸含量及成分的测定。

参考文献

[1] 于曰雪, 法芸, 杜芳林. 阀切换二维离子色谱法同时测定啤酒中游离氨基酸和糖醇[J]. 分析化学学报, 2019, 35(1): 53–58.
YU YX, FA Y, DU FL. Simultaneous determination of amino acids and alditols in beer by valve-switching two-dimensional ion chromatography [J]. J Anal Sci, 2019, 35(1): 53–58.

[2] 韩永红. 气相色谱-质谱联用技术分析啤酒麦芽中的挥发性风味物质[J]. 啤酒科技, 2018, 65(4): 1–6.
HAN YH. Analysis of volatile flavor compounds in beer malt by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Beer Technol, 2018, 65(4): 1–6.

[3] 牛丽影, 李大婧, 刘春泉, 等. 鲜食玉米中游离糖和游离氨基酸含量差异的多元统计分析[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(2): 213–220.
NIU LY, LI DJ, LIU CQ, *et al.* Multivariate statistical analysis on the content difference of free sugar and free amino acid in fresh corn [J]. Jiangsu J Agric, 2020, 36 (2): 213–220.

[4] 刘建福. 武夷岩茶游离氨基酸组分及含量分析[J]. 热带作物学报, 2017, (2): 71–74.

LIU JF. Analysis of content and composition of amino acid in Wuyi rock tea [J]. Chin J Trop Crops, 2017, (2): 71–74.

[5] 赵璇, 李新生, 韩豪, 等. 汉中茶叶氨基酸含量测定及营养价值评价分析[J]. 生物资源, 2016, 38(1): 17–23.
ZHAO X, LI XS, HAN H, *et al.* Determination and nutritional evaluation of amino acids from different varieties of Hanzhong TEA [J]. Biot Resour, 2016, 38(1): 17–23.

[6] 李娜, 钱昌丽, 鹿盼婷, 等. 中国不同哺乳阶段母乳中氨基酸含量研究[J]. 营养学报, 2021, 42(5): 7–12.
LI N, QIAN CL, LU PT, *et al.* Study on the content of amino acids in breast milk at different lactation stages in China [J]. J Nutr, 2021, 42(5): 7–12.

[7] 肖涵, 陈圆圆, 陈春月. 不同加工方式茶叶游离氨基酸组分分布特征初探[J]. 昆明学院学报, 2018, 40(6): 32–37.
XIAO H, CHEN YY, CHEN CY. Distribution characteristics of free amino acids in tea with different processing methods [J]. J Kunming Univ, 2018, 40(6): 32–37.

[8] 李巧琪, 许志彬, 黄伟乾, 等. 柱后衍生阳离子交换色谱法测定酱油中38种游离氨基酸含量[J]. 中国调味品, 2021(4): 165–168.
LI Qq, XU ZB, HUANG WQ, *et al.* Determination of 38 free amino acids in soy by post column derivatization with ion chromatography [J]. China Cond, 2021(4) : 165–168.

[9] 贺习文, 高勤叶, 黄姣姣, 等. 离子交换色谱-茚三酮柱后衍生法同时测定绿茶饮料中39种游离氨基酸[J]. 饮料工业, 2020, 23(1): 6.
HE XW, GAO QY, HUANG JJ, *et al.* Simultaneous determination of 39 free amino acids in green tea by ion exchange chromatography-ninhydrin

- post-column derivatization [J]. *Beverage Ind*, 2020, 23(1): 6.
- [10] 田翔,王君杰,秦慧彬,等.超高效液相色谱法测定不同黄酒中17种氨基酸的分析研究[J].*酿酒科技*,2019,(11):74-82.
- TIAN X, WANG JJ, QIN HB, *et al.* Determination of 17 amino acids in different yellow rice wine by ultra performance liquid chromatography [J]. *Brew Technol*, 2019, (11): 74-82.
- [11] 许永,黄丽佳,刘欣,等.柱前衍生-高效液相色谱法测定新鲜烟叶中游离氨基酸[J].*化学试剂*,2021,43(6):5-8.
- XU Y, HUANG LJ, LIU X, *et al.* Determination of free amino acids in fresh tobacco leaves by precolumn derivatization high performance liquid chromatography [J]. *Chem Reagent*, 2021, 43 (6): 5-8.
- [12] BRESSAN L, MENDEZ M, MARIA I. Validation of a reversed-phase ultra performance liquid chromatographic method with photodiode array detection for the determination of voriconazole in human serum and its application to therapeutic drug monitoring [J]. *Ther Drug Monit*, 2018. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000491
- [13] GVV L, KRR M, HPPS S, *et al.* Analysis of total amino acids in rice using a validated reversed-phase high performance liquid chromatographic method with diode array detection (RP-HPLC-DAD) [J]. *Int J Anal Bioanal Methods*, 2020. DOI: 10.35840/ijabm/2408
- [14] 罗华秀,王晓玲,王伟玲,等.藏药牦牛血粉饮片中氨基酸和无机元素测定[J].*中国测试*,2020,46(2):56-79.
- LUO HX, WANG XL, WANG WL, *et al.* Determination of amino acids and inorganic elements in Tibetan medicine yak blood powder [J]. *China Test*, 2020, 46(2): 56-79.
- [15] 唐翎,魏伟,赵勇. UPLC-MS/MS法测定猴头菌丝体中18种游离氨基酸的含量[J].*药物分析杂志*,2018,38(1):112-117.
- TANG L, WEI W, ZHAO Y. Determination of 18 free amino acids in *Hericium erinaceus* mycelium by UPLC-MS/MS [J]. *J Pharmaceutical Anal*, 2018, 38(1): 112-117.
- [16] OMAR MMA, ELBASHIR AA, SSHMITZ OJ. Capillary electrophoresis method with UV-detection for analysis of free amino acids concentrations in food [J]. *Food Chem*, 2019. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.07.060
- [17] ADRIEN R, MAGDALENA D, CAROLINE W. A chiral unified chromatography-mass spectrometry method to analyze free amino acids [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411: 4909-4917.
- [18] LIYANAARACHCHI GVV, MAHANAMA KRR, SOMASIRI HPPS, *et al.* Development and validation of a method for direct, underivatized analysis of free amino acids in rice using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 74(8): 156-158.
- [19] 郑昕,王云川,黄彦君,等. HPLC 内标法测定啤酒中游离氨基酸含量的研究[J].*酿酒*,2018,32(1):89-91.
- ZHEN X, WANG YC, HUANG YJ, *et al.* Study on the determination of free amino acids in beer by HPLC internal standard method [J]. *Liquor Mak*, 2018, 32(1): 89-91.
- [20] 周伟. 高效液相色谱分析啤酒中游离氨基酸[J].*啤酒科技*,2017,3(1):8-9.
- ZHOU W. Analysis of free amino acids in beer by high performance liquid chromatography [J]. *Beer Technol*, 2017, 3(1): 8-9.
- [21] 李梅,杨朝霞. AQC 柱前衍生高效液相色谱法测定啤酒中的21种游离氨基酸[J].*色谱*,2017,25:939-941.
- LI M, YANG ZX. Determination of 21 free amino acids in beer by high performance liquid chromatography with AQC pre-column derivatization [J]. *Chin J Chromatogr*, 2017, 25: 939-941.
- [22] VRZAL TK, DRABKOVA K, TERB A, *et al.* Pilot sensomic study revealing the potential of amino acids to highly influence sensory properties of a lager beer [J]. *J Food Compos Anal*, 2021, (1): 104028.
- [23] NALAZEK RK, KUBICA PA. Discrepancies in determination of biogenic amines in beer samples by reversed phase and hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *Microchemical J*, 2020, 159: 105574.
- [24] HOMERIN G, GHINET A, NICA AS, *et al.* Optimization of detection of native amino acids with evaporative light scattering detector in chiral supercritical fluid chromatography [J]. *Chromatographia*, 2021, 84(2): 179-185.
- [25] YE H, CAI Y, ZHANG L, *et al.* Determination of total free amino acids in *Sipunculus nudus* by UV spectrophotometry [J]. *E3S Web Conf*, 2020, 189: 02013.
- [26] 戴明,苏晓明,吴少明,等. UPLC-MS/MS 测定铁观音茶中21种游离氨基酸含量[J].*化学研究与应用*,2021,33(7):1410-1419.
- DAI M, SU XM, WU SM, *et al.* Determination of 21 kinds of free amino acids in Tieguanyin tea by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chem Res Appl*, 2021, 33(7): 1410-1419.
- [27] 吴少明,蔡小明,周鹏,等.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中6种丁香酚类物质的残留量[J].*食品科学*,2020,41(16):320-326.
- WU SM, CAI XM, ZHOU P, *et al.* Determination of 6 eugenol residues in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2020, 41(16): 320-326.

(责任编辑:郑丽于梦娇)

作者简介



吴少明,硕士,工程师,主要研究方向为食品安全研究。
E-mail: 18950496170@163.com

梁敏,硕士,工程师,主要研究方向为食品检测。
E-mail: 280257959@qq.com