

使用AccQ·Tag™ Ultra衍生化试剂盒测定酒精和非酒精饮料中的游离氨基酸含量

Gitte Barkowitz, Christopher Henry, David Gould, Henry Foddy

Waters Corporation

摘要

饮料中的必需和非必需氨基酸会对风味和味道产生影响，为此，饮料制造商通常需要进行监测。氨基酸分析一般使用传统耗时的高效液相色谱(HPLC)法，或者需要专用的氨基酸分析仪，无法用于其他应用。本文展示了一种梯度时间为10分钟快速超高效液相色谱(UPLC™)分析方法，可轻松定量氨基酸，并灵活地用于其他应用的系统。

使用AccQ·Tag Ultra衍生化试剂盒，对白葡萄酒、苹果酒和康普茶等发酵饮料以及软饮料和运动营养饮料粉末的零售样品进行衍生化。使用配备光电二极管阵列(PDA)检测器的ACQUITY™ UPLC H-Class PLUS系统，通过一组先前建立的方法进行分离，设置的波长为260 nm。使用氨基酸食品和饲料标准品试剂盒，以正缬氨酸为内标，执行示例定量。对不同饮料的稀释系数进行优化，从而为用户提供常见饮料的氨基酸分析的进一步指导。

优势

包含标准品、试剂、色谱柱、软件方法和数据分析的完整工作流程解决方案，可快速完成方法设置。

简介

饮料，尤其是发酵生产的饮料，其中的游离氨基酸谱差异很大，这可能会影响味道，从而影响消费者的接受度。对葡萄酒和啤酒生产的研究需要分析化学成分，以表征氨基酸等物质的存在。在啤酒酿造中，测量氨基酸的目的是支持味道分析^{1,2}。酿酒酵母菌株³和葡萄品种⁴的种类对葡萄酒中的游离氨基酸谱有很大影响。葡萄酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的氮可用性及其利用率可显著影响发酵动力学和对葡萄酒香气很重要的挥发性化合物的产生⁵。在葡萄酒成熟的复杂过程中，通过可靠地监测这些特征，可以为葡萄酒研究中的产品开发和表征提供有价值的信息。

不同的微生物菌株会产生不同的风味特征，根源在于发酵过程中氨基酸谱的变化。此外，微生物菌株对影响挥发物等代谢物生成的氮源有特定偏好，例如在龙舌兰酒发酵中的乙酸乙酯、丙醇、乙醛⁶。根据可用的氮源和氨基酸，植物病原真菌会产生不同水平的真菌毒素⁷。赤霉素、青霉素、头孢菌素C等真菌产品，以及受氮可用性调节的棒曲霉素和黄曲霉毒素等毒素⁸，可能对饮料制造中的食品安全产生影响。

其他饮料制造行业，如运动营养品和蛋白质补充剂，也需要表征生产批次，以寻找原料供应商并确保产品质量始终如一。使用传统HPLC方法或氨基酸分析仪来分析游离氨基酸可能会很耗时。通过将AccQ·Tag衍生化与采用光学检测的UPLC分析相结合，我们得到了一种快速可靠的质量控制应用，同时也是一种食品研究工具，可将代谢物生产与游离氨基酸的存在联系起来。

实验

样品前处理

内标正缬氨酸(P/N: 186009301 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009301-amino-acid-internal-standard-norvaline.html>>)用6 mL 0.1 M HCl复溶，得到浓度为0.25 μmol/mL的溶液。临用前取10 μL溶液加入AccQ·Tag Ultra衍生化试剂盒提供的60 μL硼酸盐缓冲液中。然后根据《AccQ·Tag Ultra衍生化试剂盒维护和使用手册》(AccQ·Tag Ultra Derivatization Kit Care and Use Manual) (715001331EN <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715001331.pdf>>)使用缓冲液对饮料样品进行衍生化，使用含有内标的硼酸盐缓冲液进行修改(图1)。使用含有21种氨基酸的氨基酸食品和饲料标准品试剂盒(P/N: 186009299 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009299-amino-acid-food-and-feed-standard-kit.html>>)制备校准曲线。该标准品专为鉴定和定量氨基酸分析而设计。使用说明请参考《氨基酸标准品试剂盒维护和使用手册》(720006663ZH <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720006663en.pdf>>)。通过在沃特世全回收样品瓶(P/N: 186000384C <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/vials-containers--collection-plates/186000384c-lcgc-certified-clear-glass-12-x-32-mm-screw-neck-vial-total-reco.html>>)中进行衍生化

，可以将反应容器直接转移到UPLC自动进样器中，以实现无缝分析并尽量减小试剂使用量。在对衍生化工作流程进行细微修改之前，将反应混合物从加热器中取出，冷却，然后以500 rcf的速度短暂地离心10秒，这一步要将样品瓶放入15 mL塑料管中使冷凝物沉底。ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统已按照既有的Empower™ CDS软件方法完成设置，在此分析中无需进行任何修改。已将处理方法中的正缬氨酸默认值调整为25 μM，以反映上述稀释度和此应用的默认进样量1 μL。



图1.液体样品的衍生化工作流程。内标已预先添加到硼酸盐缓冲液中。

使用分段校准曲线运行样品以定量。为了考虑不同氨基酸的不同量并在校准曲线范围内充分定量，我们建议将每个未稀释的液体样品衍生化，并以1:10、1:20和1:100的比例稀释。本研究中的液体样品不需要更高的稀释度。按照制造商标签的说明稀释运动饮料氨基酸粉末，其含量范围为每5 g粉末含1-2 g氨基酸，因此稀释6.55 g粉末需要用100 mL去离子水。建议按1:400的比例用去离子水稀释以待分析。表1所示为能够对给定饮料样品中的大多数氨基酸进行定量的稀释度。

样品代码	样品类型	用水稀释的理想稀释比
A	椰子汁	1:10
B	可乐 (全球品牌)	不稀释
C	功能饮料 (全球品牌)	1:10
D	功能饮料 (当地品牌)	不稀释
E	康普茶 (覆盆子)	不稀释
F	苹果酒 (无酒精, 混合水果)	不稀释
G	浑浊苹果汁	1:100
H	淡啤酒	1:10
J	白葡萄酒	1:20
K	维生素水 (苹果和接骨木果)	1:20
L	维生素水 (橙子、芒果和百香果)	1:20
BCAA	含支链氨基酸的饮料粉末 (西瓜味)	1:400 (100 mL稀释6.55 mg)

表1. 让一种样品类型的所有或大部分氨基酸落在校准曲线范围内的推荐稀释度

内标可以在开始制备样品前添加到硼酸盐缓冲液中。如上所述，用10 μL 正缬氨酸溶液制备60 μL 硼酸盐缓冲液的混合储备液（如果按照制造商的说明用6 mL 0.1 M HCl复溶，则得到的浓度为250 μM ），每个样品的浓度为每瓶100 μL 反应体积中含有2500 pmol正缬氨酸。本方法的进样量为1 μL ，也就是25 μM ，因此需要在Empower处理方法中更改原本的默认值1 μM 。

未知峰调查

使用以下三种条件对天冬酰胺进行标准培养：1)水 2) 0.1 M HCl水溶液 3)苹果汁，每次衍生化使用500 pmol天冬酰胺。500 pmol的量取自表2的中间范围值，该表列出了沃特世推荐的不同AccQ·Tag衍生化的理想样品量。

样品	样品量	含量范围
蛋白质	0.1-10.0 μg	10-200 pmol
肽	0.01-1.0 μg	10-1000 pmol

表2. 样品体积为10 μL 时，AccQ·Tag衍生化的推荐样品量

梯度

已使用随AccQ·Tag解决方案提供的Waters Empower方法组的梯度食品和饲料。

结果与讨论

对所有样品组运行七点分段式校准曲线。R²的范围为0.984 (MetSO₂)~0.9999 (Val, Ile, Leu, Ser, Thr, Pro)。图2是在Empower 3软件中使用提供的方法进行处理后得到的校准曲线示例。图3是使用Empower软件处理的屏幕截图，展示了校准曲线相关系数的典型结果。

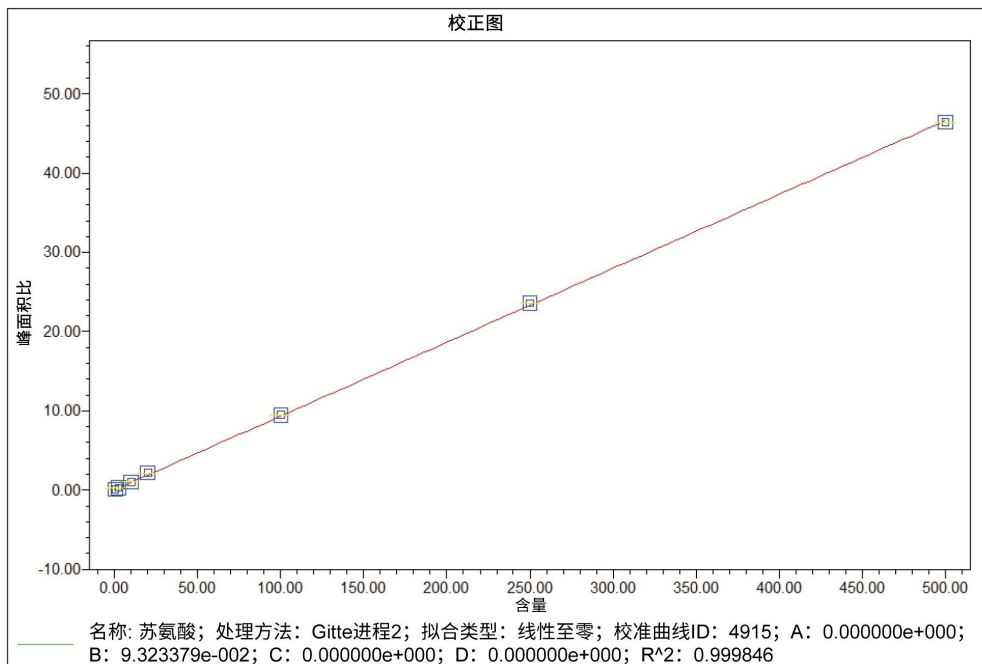


图2. 苏氨酸的校准曲线

E	Date Calibrated	Name	Time (min)	Channel	R ²	Equation
1	8/4/2022 10:03:51 AM BST	AMQ	1.445	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.000000	Y = 1.14e+004 X
2	8/4/2022 10:03:51 AM BST	NH3	1.886	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.000000	Y = 3.62e+001 X
3	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Cya	2.212	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.994909	Y = 8.71e-002 X
4	8/4/2022 10:03:51 AM BST	His	2.410	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.995618	Y = 8.08e-002 X
5	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Tau	3.178	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.996666	Y = 9.34e-002 X
6	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Ser	3.418	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.999430	Y = 8.16e-002 X
7	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Arg	3.574	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.998030	Y = 8.33e-002 X
8	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Gly	3.736	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.998527	Y = 9.03e-002 X
9	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Asp	4.140	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.998316	Y = 7.62e-002 X
10	8/4/2022 10:03:51 AM BST	MetSO2	4.237	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.984061	Y = 1.13e-001 X
11	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Glu	4.682	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.998298	Y = 7.62e-002 X
12	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Thr	5.099	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.999846	Y = 9.32e-002 X
13	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Ala	5.524	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.998364	Y = 8.00e-002 X
14	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Pro	6.156	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.999452	Y = 8.21e-002 X
15	8/4/2022 10:03:51 AM BST	AABA	6.819	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.998945	Y = 8.70e-002 X
16	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Deriv Peak	7.079	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.000000	Y = 2.42e-001 X
17	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Cys	7.191	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.993287	Y = 1.64e-001 X
18	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Lys	7.256	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.995719	Y = 1.19e-001 X
19	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Tyr	7.346	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.994854	Y = 9.84e-002 X
20	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Met	7.480	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.998954	Y = 9.18e-002 X
21	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Val	7.574	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.999317	Y = 8.79e-002 X
22	8/4/2022 10:03:51 AM BST	NVa	7.671	2998 Ch1 260nm@4.8nm	1.000000	Y = 4.68e+003 X
23	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Ile	8.145	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.999601	Y = 9.00e-002 X
24	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Leu	8.221	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.999649	Y = 8.79e-002 X
25	8/4/2022 10:03:51 AM BST	Phe	8.325	2998 Ch1 260nm@4.8nm	0.996118	Y = 9.87e-002 X

图3.单个分析物的校准结果。氨基酸食品和饲料标准品试剂盒中包含21种标准品。AMQ（即6-氨基喹啉，与水反应的AccQ•Tag试剂）、NH₃和衍生峰（双氨基喹啉脲）均包含在所提供的方法中。选择正缬氨酸(NVa)作为内标添加到方法中，显示R² = 1。除胱氨酸(0.25-250 μM)外，所有氨基酸分析物的浓度范围均为0.5-500 μM。

标准品的三次衍生化显示技术重复样的标准偏差较低，计算分析化合物的峰面积计数时平均为4%。衍生化速度很快，可以使用沃特世全回收样品瓶在传统加热块中进行，然后在同一天或在室温下储存长达一周后转移到UPLC自动进样器中。因此分析人员可以灵活地安排样品分析，无需重新制备样品。

图4显示了未稀释饮料的典型色谱图，可以大致反映所研究产品中存在的化合物。使用提供的Empower CDS方法组定量分析样品，但由于缺乏能够对比结果的参比物质，因此仅显示了牛磺酸的结果以及与标签的对比。根据计算，样品C（功能饮料）中的牛磺酸含量为0.44 g/100 mL，与产品标签上的规定含量0.4 g/100 mL非常接近。

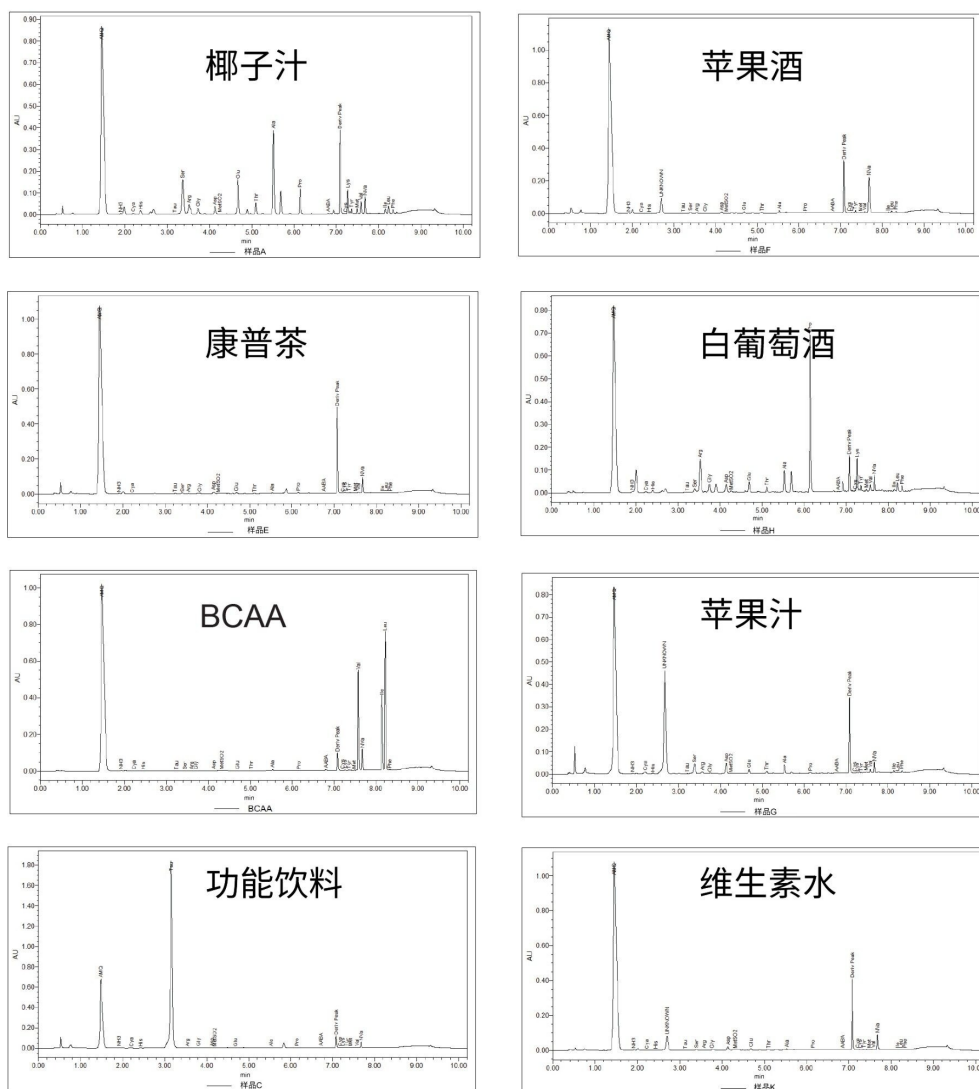


图4.经过衍生化处理的未稀释饮料样品的典型色谱图

本研究中分析的三种含有苹果的产品（苹果汁、苹果酒、苹果和接骨木果维生素水）在组氨酸和牛磺酸之间显示出高强度、一致的未知峰洗脱（图5）。之前使用AccQ·Tag Ultra衍生化试剂盒进行鉴定时，大多数苹果汁中观察到的主要氨基酸有L-天冬酰胺、L-天冬氨酸和L-谷氨酰胺⁽⁹⁾。根据洗脱时间，推测未知峰是天冬酰胺。这可以通过进样相同标准品来证实，标准品使用AccQ·Tag Ultra衍生化试剂盒（数据未显示）在三种不同的样品溶剂中进行天冬酰胺衍生化。AccQ·Tag衍生化的一个常见问题是参考标准品中存在多个胺基，这可能导致双峰（例如天冬酰胺）。为了鉴定峰，建议在校准曲线的浓度范围内进行培养，使衍生化试剂与样品比例过量，并让参考标

准品培养的pH值接近样品。如果要研究蛋白质或肽的水解产物，我们建议使用表2中所述的量（来自沃特世内部文件）。

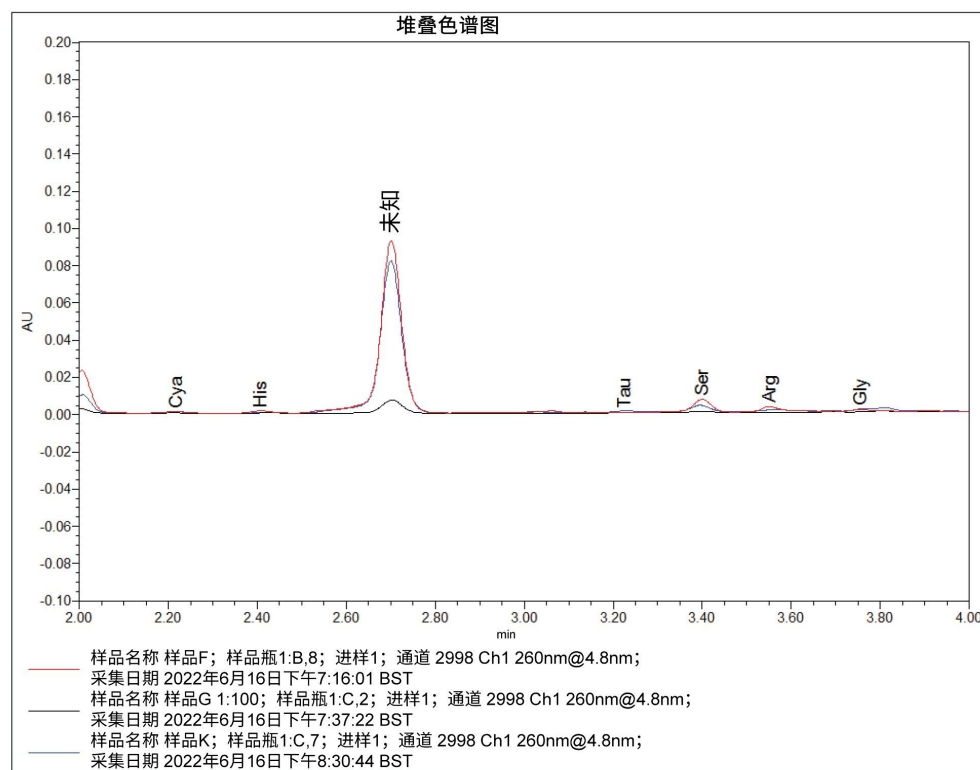


图5.在含有苹果的产品中发现的未知峰的叠加图。样品G有大量未知峰，并已稀释用于对比，样品F-苹果酒、样品G-浑浊苹果汁、样品K-苹果和接骨木果维生素水。

结论

AccQ·Tag氨基酸解决方案开箱即用，可通过全面的软件处理包加快方法开发，与专用的氨基酸分析仪相比，在仪器使用方面更加灵活。本研究通过对样品前处理进行少量修改（离心步骤），测试了各种饮料样品，并在七点校准曲线中研究了检测的线性。在鉴定未知物方面，我们为参考标准品的研究提供了建议，旨在更快地鉴定所研究的峰。分析饮料中的游离氨基酸是一种直接的方法，样品前处理非常简单，只需稀释液体样品即可在衍生化之前使所有研究的分析物达到校准标准品的浓度范围。AccQ·Tag Ultra衍生化和UPLC分离能切实地为氨基酸的常

规分析提供可重复且可靠的分析解决方案，同时也是一种简便易用的方法，能够为忙于质量控制和发酵饮料研究的实验室减轻方法开发负担。

参考资料

1. Bauwens J, Van Opstaele F, Eggermont L, Weiland F, Jaskula-Goiris B, De Rouck G, *et al*. Comprehensive analytical and sensory profiling of non-alcoholic beers and their pale lager beer counterparts. *J Inst Brew*. 2021 Jan 1;127(4):385–405. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jib.664>.
2. Benvenuti ME, Hong P. Determination of Amino Acids in Beers Using the UPLC Amino Acid Analysis Solution. Waters Application Note, [720002158](#), 2007.
3. Fiechter G, Mayer HK. UPLC analysis of free amino acids in wines: profiling of on-lees aged wines. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011 May 15; 879(17–18):1361–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21371950/>.
4. Hernández-Orte P, Peña-Gallego A, Ibarz MJ, Cacho J, Ferreira V. Determination of the biogenic amines in musts and wines before and after malolactic fermentation using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate as the derivatizing agent. *J Chromatogr A*. 2006 Oct 6; 1129(2):160–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16876810/>.
5. Fairbairn S, McKinnon A, Musarurwa HT, Ferreira AC, Bauer FF. The impact of single amino acids on growth and volatile aroma production by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Front Microbiol*. 2017 Dec 19; 8(DEC):2554. Available from: </pmc/articles/PMC5742263/>.
6. Arrizon J, Gschaedler A. Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *J Appl Microbiol*. 2007 Apr;102(4):1123–31.
7. Bouras N, Holtz MD, Aboukhaddour R, Strelkov SE. Influence of nitrogen sources on growth and mycotoxin production by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from wheat. *Crop J*. 2016 Apr 1;4(2):119–28.
8. Barrios-Gonzalez J. Secondary Metabolites Production. *Curr Dev Biotechnol Bioeng*. 2018; 257–83.

9. Ma S, Neilson AP, Lahne J, Peck GM, O' Keefe SF, Stewart AC. Free amino acid composition of apple juices with potential for cider making as determined by UPLC-PDA. *J Inst Brew*. 2018 Oct 1; 124(4):467–76. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jib.519>.

特色产品

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/10138533>](https://www.waters.com/10138533)

[ACQUITY UPLC PDA检测器 <https://www.waters.com/514225>](https://www.waters.com/514225)

[Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720007707ZH, 2022年8月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号