



戴安（DIONEX）园地

AN46啤酒中多种成分的离子色谱法分析

离子色谱是分析和定量溶液中离子的有效技术。虽然已有很多技术，包括气相色谱、液相色谱、基于酶的技术和湿法化学方法用于啤酒分析，离子色谱正迅速成为可选方法之一。

啤酒工业中感兴趣的化合物有很多，如无机阴离子、有机酸、以及与啤酒花的味道和苦味有关的物质如蛋白质、糖和醇类。测定这些物质的含量可以监测发酵程度。测定加工好的啤酒产品中添加的保护剂和着色剂的浓度，有助于确保生产的可靠性。

啤酒制造过程的第一步是将大麦，有时是其它谷物，浸泡在温水中。大麦中的酶将谷物中的淀粉降解为葡萄糖、麦芽糖和其他低聚和高聚糖。这个过程称作淀粉糖化，产生的溶液称作新鲜的麦芽汁。新鲜的麦芽汁然后用啤酒花处理，产生啤酒花麦芽汁。加入酵母，小分子糖会发酵产生醇。因为啤酒中不同成分的浓度、化学行为和分子量差别较大，它们的分离和测定就存在一定困难。离子色谱为监测酿酒过程和最终产品中的重要化合物提供了很好的检测方法。

本文用离子交换或离子排斥色谱法测定发酵工业中感兴趣的五类化合物，包括糖、醇、有机酸、无机阴离子和无机阳离子。用两种电化学检测器中的一种——脉冲安培或电导法检测。

1 分析方法

1.1 仪器和试剂

戴安公司的色谱系统，包括梯度泵、色谱单元、电化学检测器（包括脉冲安培和电导两种模式）、淋洗液组织器、PeakNet色谱工作站。

去离子水（电阻率需大于 $17.8\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ），醋酸钠（Sigma），50%（W/W）氢氧化钠（Fisher Scientific），甲醇（EM Science），高氯酸（Fisher Scientific），甲烷磺酸（Fluka Chemika-BioChemika），四丁基氢氧化铵（TMAH）（Dionex P/N 39602），全氟丁酸（Fluka Chemika-BioChemika）。

1.2 溶液和试剂的配制

1.0 mol/L 醋酸钠 称取 82.0g 无水醋酸钠于 1L 的容量瓶中，加入约 600ml 水，摇匀。当盐完全溶解后，用去离子水定容至刻度。该溶液过 0.2 μm 膜过滤。

500 mmol/L 氢氧化钠 称取 974g（974ml）去离子水于淋洗液瓶中。脱气 10min。在天秤上将该瓶脱去皮重，直接向瓶中加入 40g（26.2ml）50%（W/W）氢氧化钠。将淋洗液瓶迅速放置在系统上，通入惰性气体氮气进行保护。

100 mmol/L 氢氧化钠 称取 992g（992ml）去离子水于淋洗液瓶中。脱气 10min。在天秤上将该瓶脱去皮重，直接向瓶中加入 8g（5.25ml）50%（W/W）氢氧化钠。将淋洗液瓶迅速放置在系统上，通入惰性气体氮气进行保护。

1.0 mmol/L 氢氧化钠 称取 990g（990ml）去离子水于淋洗液瓶中。脱气 10min。向瓶中加入 100mmol/L 氢氧化钠 10ml。将淋洗液瓶迅速放置在系统上，通入惰性气体氮气进行保护。

100 mmol/L 甲烷磺酸 称取 9.61g 甲烷磺酸于盛 500ml 去离子水的淋洗液瓶中。稀释至刻度并混匀。

100 mmol/L 高氯酸 称取 8.60ml 高氯酸于盛 992ml 去离子水的淋洗液瓶中。混匀。

0.8 mmol/L 全氟丁酸 全氟丁酸购自 Fluka，10ml 包装。将全部 10ml 全氟丁酸用去离子水稀释至 1L 配制成 77.2nmol/L 全氟丁酸存储溶液。取此存储溶液 10.4g 用去离子水定容至 1L 得到 0.8mmol/L 工作溶液。

5.00 mmol/L 四丁基氢氧化铵 称取 50ml Dionex 0.1mol/L TBAOH 离子对试剂（P/N 35360）于去离子水中并定容至 1L。配制几升这种再生液。

2 糖分析

糖和其它含羟基官能团的化合物都能够在金电极表面氧化产生电流从而被检测。早期，循环三电位用于糖的分析，首先将糖氧化，而后施加较大的正电位将氧化产物从电极表面清除，而后施加负电位。这个循环电位每秒钟重复一次，消除电极中毒，保证有重现性的响应。如果不施加循环电位，峰高会随电极表面的逐渐中毒而逐步降低。图 1

为离子交换色谱脉冲安培检测分析糖类的色谱图。电化学检测器中的电位波形均如表 1 所示。积分时间从 0.2s 到 0.4s TN21 中描述了另外一个波形，在有些情况下，可以给出更好的结果。

表 1 离子色谱法金电极分析糖类的 ED40 电位波形

时间 /s	0.00	0.20	0.40	0.41	0.60	0.61	1.00
电位 /V	0.05	0.05	0.05	0.75	0.75	-0.15	-0.15

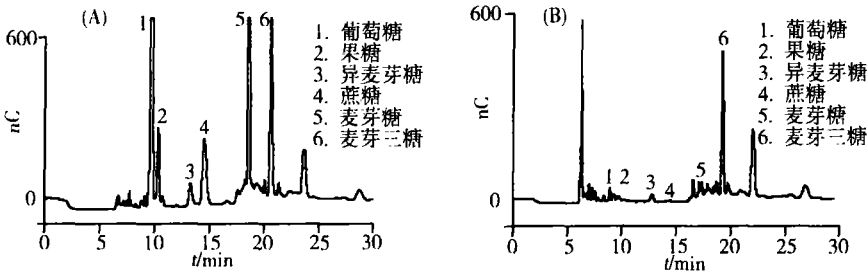


图 1 离子交换色谱脉冲安培检测器分析糖类
(实验条件如表 2 所示，样品在进样前稀释 10 倍。(A) 麦芽汁中的发酵糖，(B) 单、双、三糖)

因为糖的 pK_a 在 12—14 之间，能够用离子交换色谱以阴离子的形式进行分离。为了推动工作电极表面氧化反应的进行，淋洗液的 pH 必须在 12 以上。Dionex CarboPac 系列的柱子都是聚合物柱，在 pH 0—14 范围内稳定。用 NaOH 梯度淋洗，糖在 CarboPac PA1 上的分离顺序为：单糖、双糖和三糖。

表 2 离子色谱法分析啤酒和麦芽汁中单糖、双糖和三糖的实验条件

分析柱: CarboPac PA 1; 淋洗液 1: 去离子水; 淋洗液 2: 500mmol L ⁻¹ NaOH									
	时间 /min	E1	E2	注释		时间 /min	E1	E2	注释
梯度	开始	99	1	再平衡		20.00	91	9	
	5.00	99	1	进样		45.00	0	100	
	6.00	99	1	回到装载状态		50.00	0	100	
流速: 1.0 mL min ⁻¹ ; 进样体积: 10μL 检测: 脉冲安培检测, 金电极, 电位波形见表 1									

发酵工业中最重要的糖是发酵糖。一般来说，聚合度在 DP3 以上的糖不可发酵，然而，它们对热量和啤酒的整体口味有贡献。图 1(A) 是啤酒花麦芽汁样品中发酵糖 ($\leq DP3$) 分离的色谱图。这些糖可被酵母转化为醇。成品啤酒和制造过程中的啤酒的区别是非常明显的。与预期相同，麦芽汁中的发酵糖的浓度大于最终的啤酒产品。

可以被酶分解产生高发酵性麦芽汁的糖、淀粉和糊精是由葡萄糖的亚单元增大而成。麦芽糖是最简单的复合糖，有两分子的葡萄糖单元通过 α -1, 4 位连接在一起。依照惯例，链以参与连接的葡萄糖单元的数目命名。例如，麦芽四糖 (DP4)，是四个葡萄糖单元通过 α -1, 4 位连接在一起的。

图 2 是用 CarboPac PA100 柱分析啤酒中聚合度 DP3 到 DP10 麦芽低聚糖的色谱图。直到聚合度 DP15 的麦芽低聚糖都可以获得很好的分离。如表 3 的实验条件所示，淋洗液中含有氢氧化钠和醋酸钠。醋酸钠可以增大淋洗强度，降低低聚糖的保留时间。若没有醋酸钠，低聚糖也可以分离，只是运行时间会很长。

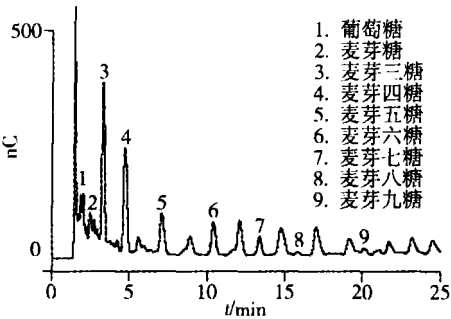


图 2 离子交换色谱脉冲安培检测器分析麦芽低聚糖
(实验条件如表 3 所示，样品在进样前稀释 10 倍)

表 3 离子色谱法分析啤酒中低聚糖的实验条件

分析柱: CarboPac PA10Q 淋洗液 1: 去离子水; 淋洗液 2: 500mmol·L ⁻¹ NaOH; 淋洗液 3: 1mol·L ⁻¹ NaAc											
	时间 /min	E1	E2	E3	注释		时间 /min	E1	E2	E3	注释
梯度	开始	57	33	10	再平衡		6.50	57	33	10	梯度开始
	1.50	57	33	10	进样		31.50	42	33	25	梯度结束
流速: 1.0 ml·min ⁻¹ ; 样体积: 10μl 检测: 脉冲安培检测, 金电极, 电位波形见表 1											

3 醇分析

一般情况下，啤酒中大量存在的两种醇为乙醇和甘油。甘油是啤酒的重要组成成分，对啤酒的风味有重要影响，而且它比葡萄糖甜。乙醇和甘油可以用离子排斥法分离，脉冲安培检测，波形如表 4 所示。积分区间为 0.05—0.25s

IonPac ICE-AS6 柱是离子排斥柱，可用于分离醇类。分离甘油和乙醇的实验条件如表 5 所示。图 3 是用离子排斥色谱脉冲安培检测（铂电极）分析啤酒中乙醇和甘油的色谱图。

表 4 离子排斥色谱法铂电极分析醇类的 ED40 电位波形

时间 /s	0.00	0.05	0.25	0.26	0.60	0.61	1.00
电位 /V	0.30	0.30	0.30	1.25	1.25	0.10	0.10

表 5 离子排斥色谱法 IonPac ICE-AS6 柱分析甘油和乙醇的实验条件

分析柱: IonPac ICE-AS6 淋洗液: 100mmol/L 高氯酸; 流速: 2.0 mL/min; 进样体积: 10μL 检测: 脉冲安培检测, 铂电极, 电位波形见表 4
--

4 有机酸分析

啤酒生产过程的各个阶段中有机酸含量的测定有助于追踪发酵的代谢产物，与啤酒的风味取向建立联系。分析有机酸的一种方法是离子排斥色谱法抑制型电导检测。IonPac ICE-AS6 柱是离子排斥色谱柱，用于有效分离低分子量脂肪族有机酸（包括羟基取代的有机酸）、脂肪族醇类和甘油。用这种分离机理，弱电离的化合物基于 pK_a s 的不同进行分离。强无机酸阴离子在固定相上没有保留，在柱子的死体积洗脱。IonPac ICE-AS6 柱的标准淋洗液是 0.4 mmol/L Cl^- 全氟丁酸。其他单质子有机酸也可以使用，但背景电导会略高。实验条件如表 6 所示。

表 6 离子排斥色谱法 IonPac ICE-AS6 柱分析啤酒中有机酸的实验条件

分析柱: IonPac ICE-AS6 淋洗液: 0.8 mmol/L Cl^- 全氟丁酸; 流速: 1.0 mL/min; 进样体积: 25μL 检测: 抑制型电导检测, AMMS-ICE; 再生液: 5mmol/L TBAOH, 5 mL/min

图 4 是烈性啤酒中有机酸分析的色谱图。样品脱气并稀释 40 倍后进样分析。草酸和马来酸在“水峰”的两侧洗脱，被强酸阴离子如氟离子和氯离子的峰掩盖。丙酮酸、柠檬酸、苹果酸、甲酸、乳酸、乙酸、琥珀酸均可基线分离。乙酸根的存在可以证明存在氧化，而丙酮酸是葡萄糖向醇发生转化的中间产物。乳酸是葡萄糖和其他糖在乳酸菌的作用下产生的，在大部分的啤酒中含量都很低。有些未知峰也可以分离。

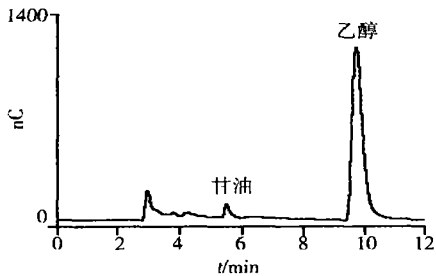


图 3 离子排斥色谱脉冲安培检测美国啤酒中的甘油和乙醇
(实验条件如表 5 所示，样品稀释 10 倍后进样)

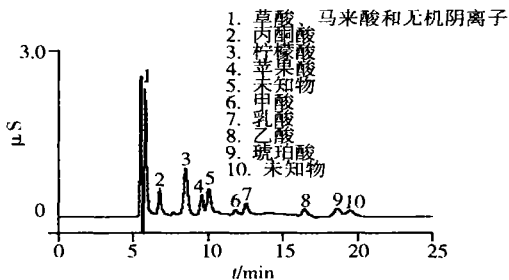


图 4 英国烈性啤酒中的有机酸分析
(实验条件如表 6 所示，样品稀释 40 倍后进样)

5 无机阴离子

无机阴离子是酿酒用的水中引入的，对啤酒的风味也有重要影响。因此，用离子色谱法监测水中阴离子的含量必须保证水的纯度和每次用水的一致性。虽然故意加入高含量的某些离子如硫酸根离子将酿酒用水作硬化处理，过量的硫酸根和氯离子对啤酒的风味会产生不好的影响。另外，高浓度其他阴离子，如硝酸根（它是否会转化为亚硝酸根）在发酵过程中会损害酵母。因此，监测阴离子的含量在酿酒工业中也是质量控制的重要步骤。

无机阴离子可以用阴离子交换色谱分离，抑制型电导检测，表 7 为实验条件。用 IonPac AS11 柱进行梯度洗脱时，为了得到较低的背景电导，要用氢氧化钠梯度，而不是碳酸盐。应在梯度泵和进样阀之间安装阴离子捕获柱以减小梯度淋洗时淋洗液中阴离子污染引起的基线漂移。

图 5 是 IonPac AS11 柱同时分析美国淡色啤酒中无机和有机阴离子的色谱图。样品进样前脱气并稀释 40 倍。淋洗

液 2 中氢氧化钠的浓度非常低，以保证氟离子在死体积后洗脱，而且几个弱保留的单电荷有机酸也能够分离。淋洗液中加入甲醇可以改变疏水性较强的离子在柱子上的选择性，使得琥珀酸-苹果酸和酒石酸-马来酸这两组有机酸的分离成为可能，否则这两组有机酸同时洗脱。因此，用表 7 中的条件，可以同时分离强酸阴离子和种类很多的弱有机酸。为了得到基线平坦的色谱图，在 PeakNet 软件中选择基线扣除技术。本方法保留时间的重现性优于 0.5%，峰面积的重现性优于 2%，线性范围达 1.5 个数量级，线性相关系数为 0.999。

表 7 IonPacAS11 分析啤酒中无机阴离子的实验条件

分析柱: IonPacAS11											淋洗液 1 去离子水;				淋洗液 2 1mmol• l ⁻¹ NaOH;				淋洗液 3 100mmol• l ⁻¹ NaAc				淋洗液 4: 甲醇			
		时间 /min		E1		E2		E3		E4				时间 /min		E1		E2		E3		E4				
梯度		开始		80		20								18.00		42				38		20				
		3.00		80		20								18.01		80		20								
		5.00		66		20																				
流速: 2.0 ml• min ⁻¹ ; 进样体积: 25μl 检测: 抑制型电导检测, ASRS 自再生循环模式																										

第一个洗脱的阴离子是氟离子。氟离子经常被加入到市政水中防止蛀牙，但在酿酒工业中却是有害的。氯离子接着洗脱，其浓度在 250 mg·L⁻¹ 以上，能提高啤酒的甜度。然而，氯离子也会妨碍酵母絮凝。硝酸根离子的存在在酿酒过程中一度被认为是一个很大的问题，但现在发现是硝酸根转化产生的亚硝酸根对发酵代谢过程有影响，会导致发酵不完全。硫酸根在水中天然存在，但对风味较好的加入啤酒花的啤酒会产生强烈的干涩的口味。最后，磷酸盐在麦芽中存在，会将麦芽汁的 pH 缓冲到弱酸性范围。

6 无机阳离子

与无机阴离子的情况类似，大部分的无机阳离子也会从水源中引入啤酒。啤酒中含量最多的四种无机阳离子是钠离子、钾离子、钙离子和镁离子。某些阳离子影响麦芽汁的 pH 值，而其他阳离子则会影响啤酒的口味。其他金属，如铅、铜和锌，不管其含量高低，都是有毒的，应监测其含量。本应用注解集中讨论了碱金属和碱土金属。

无机阳离子用离子交换色谱法分离，抑制型电导检测，如表 8 所示。梯度分离使得钡和锶可以与其他五种阳离子同时分离，如图 6 所示。在 5min 时改变淋洗液梯度，使淋洗强度增大，二价离子可以得到尖锐的峰。该方法保留时间的重现性优于 0.5%，峰面积的重现性优于 2%，线性范围达 2 个数量级，除铵离子外，线性相关系数优于 0.999。如果不监测钡离子和锶离子的含量，淋洗条件可以作改动，只需等度分离五种阳离子，分析时间约 10min。如图 6 所示。如果只需等度淋洗，甲烷磺酸的浓度可以为 20mmol·L⁻¹。

表 8 IonPacCS12 分析啤酒中无机阳离子的实验条件

分析柱: IonPacCS12, IonPacCG 12 (4mm), IonPacCTC-1阳离子捕获柱;					淋洗液 1: 去离子水; 淋洗液 2: 100mmol L ⁻¹ 甲烷磺酸					
	时间 /min	E1	E2	E3	E4	时间 /min	E1	E2	E3	E4
梯度	开始	84	16			10.00	60	40		
	5.00	84	16			10.01	84	16		
	5.01	60	40							
流速: 1.0 mL min ⁻¹ ; 进样体积: 25μL 检测: 抑制型电导检测, CSRS 自再生循环模式										

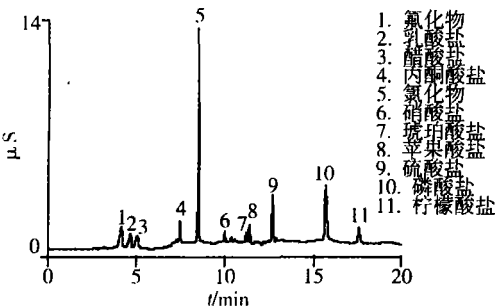


图 5 离子交换色谱法分离美国储藏啤酒中的无机阴离子和有机酸

(实验条件如表 7 所示，样品稀释 40 倍后进样)

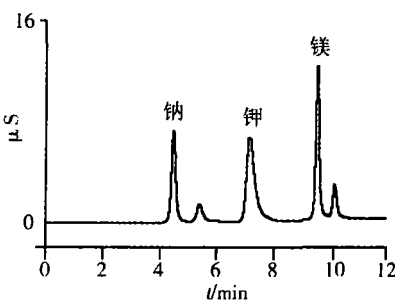


图 6 IonpacCS12 柱离子交换色谱法分离美国储藏啤酒中的无机阳离子

(实验条件如表 8 所示，样品稀释 40 倍后进样)

图 6是用 IonPacCS12柱分析啤酒中主要无机阳离子的谱图。样品在进样前脱气并稀释 40倍。钠离子首先被洗脱,浓度在 $75-150\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 的钠离子与氯离子一起可以使啤酒有柔滑的感觉。然而,如果啤酒中含有过多的硫酸根,钠离子会导致啤酒产生令人不愉快的生硬的感觉。钾离子是第二个洗脱的金属离子,与钠离子类似,会导致啤酒有轻微的咸味。它也会阻碍麦芽汁中某些酶发挥作用。镁离子在 $10-20\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 时是酵母的重要营养元素,但含量高于 $20\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 后会导致啤酒有强烈的苦味和酸味。钙离子可能是最重要的金属元素,因为它与麦芽汁中的磷酸根反应会降低麦芽汁的 pH。它也会促进酶反应,但对啤酒的口味没有影响。

7 结论

糖、醇、有机酸、无机阴离子和无机阳离子都能用不同的离子交换或离子排斥柱分离,用脉冲安培或抑制型电导检测。虽然这些成分都可以用其他分析仪器单独测定,用同一台仪器分析种类繁多的化合物可以大大缩短分析时间,节约仪器成本。离子色谱是能满足啤酒中多种成分分析的多功能技术。

戴安中国有限公司应用研究中心 供稿

第一期“环境化学前沿论坛”成功举行

为促进国内外学术交流,活跃学术气氛,中国科学院生态环境研究中心环境化学与生态毒理学国家重点实验室决定定期举行“环境化学前沿论坛”,邀请国内外著名专家就环境化学研究的前沿课题以及相关领域的最新进展举办学术讲座。第一期论坛于 2006年 10月 18日在中国科学院生态环境研究中心举行,会议由环境化学与生态毒理学国家重点实验室副主任林金明研究员主持,中心副主任江桂斌研究员作了题为“环境化学的回顾与展望”的报告。江桂斌研究员的报告分为四大部分:(1)环境化学发展的历史渊源与成就;(2)环境化学发展的机遇和前沿领域;(3)定型污染物研究进展;(4)如何向 ES&T 杂志投稿。在报告中,江桂斌研究员不仅就环境化学的发展历史与未来发展趋势进行了论述,并介绍了中国科学院生态环境研究中心环境化学和生态毒理学国家重点实验室近年来取得的成就及将来的发展目标。江桂斌研究员指出,在未来几年内,希望通过重点实验室全体研究人员以及研究生的共同努力,争取把实验室发展成为国际知名的环境化学研究机构。同时还就环境化学全体研究人员非常关注的如何向 ES&T 杂志投稿的问题介绍了相关经验和技巧,并鼓励大家做好实验,多发表有创新的高水平研究论文。通过江桂斌研究员的报告,全体研究人员对环境化学与生态毒理学国家重点实验室有了更深一步的认识,同时坚定了重点实验室未来向国际知名科研机构发展的信心。此次报告也使全体研究人员和研究生进一步了解了本学科的前沿动态,进一步掌握了本领域的发展趋势。我们期待环境化学前沿论坛愈办愈精彩。

环境化学与生态毒理学国家重点实验室办公室 吴菁京 供稿