

## 高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测法分析啤酒和麦汁中的糖

潘媛媛, 梁立娜, 蔡亚岐, 牟世芬

(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, 北京 100085)

**摘要** :建立了高效阴离子交换色谱-脉冲安培检测(HPAEC-PAD)同时测定单糖、二糖和多种低聚糖的方法。采用水、0.25 mmol/L NaOH 溶液和 1 mol/L NaAc 溶液三元梯度淋洗,在 CarboPac PA-100 色谱柱上,11 种糖在 40 min 内达到良好分离;采用积分脉冲安培检测方法,无需对样品进行复杂的前处理或衍生反应便可直接检测。11 种糖的检出限( $S/N=3$ )在 13 ~ 88 pg 范围内。将该方法用于啤酒和麦汁样品中单糖、二糖及低聚糖的分析取得了很好的结果,样品中的加标回收率为 81% ~ 107%。

**关键词** :高效阴离子交换色谱;脉冲安培检测;糖;啤酒;麦汁

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)05-0626-05 栏目类别 :研究论文

## Analyse of sugars in beer and wort using high performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection

PAN Yuanyuan, LIANG Lina, CAI Yaqi, MOU Shifen

(State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Science, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

**Abstract** :The method of the simultaneous and direct analysis of eleven sugars, including monosaccharides, disaccharides and oligosaccharides, was established using high performance anion-exchange chromatography (HPAEC) coupled with pulsed amperometric detection (PAD) using an Au working electrode and a pH-Ag/AgCl reference electrode. The separation was accomplished on a CarboPac PA-100 column by using gradient elution consisting of water, 0.25 mol/L NaOH and 1 mol/L NaAc as mobile phase at a flow rate of 0.25 mL/min. Under these conditions, glucose, fructose, sucrose, maltose, isomaltose, maltotriose, isomaltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose and maltoheptaose were separated in 40 min. Then sugars were detected directly with PAD method without any derivatization reaction, and there was no need to employ complicated pretreatment procedures to the samples before analysis. The detection limits ( $S/N=3$ ) for the sugars were 13 - 88 pg. The proposed method was applied for the determination of the 11 sugars in beer and wort samples satisfactorily, with the spiked recoveries of most sugars ranging from 81% to 107%. In addition, some potential transition mechanism of the sugars during the brewage procedure can be deduced from the comparison of sugar contents between beer and wort.

**Key words** :high performance anion-exchange chromatography (HPAEC); pulsed amperometric detection (PAD); sugars; beer; wort

糖在生物环境中分布广泛,在许多生命体系中发挥着重要作用。糖类化合物的分析对生命科学、食品科学、药理学、农业科学都有着重要意义。在啤酒和麦汁中,糖是重要的组成成分,各种糖的含量以及相互之间的比例关系,与产品的质量评价和生产

工艺的优化都有着重要的关系。例如,单糖和二糖的多少会直接影响啤酒的甜度;低聚糖随着聚合度的增加,甜度降低,特别是聚合度大于 4 的低聚糖对啤酒品质(如口感和滋补营养性等)具有重要的贡献<sup>[1]</sup>。啤酒的发酵原料麦汁中糖类物质尤其是低

聚糖的含量丰富,优化麦汁中各种糖的组合以及采取不同的发酵工艺可以生产出多种风味和口感丰富的啤酒产品<sup>[1]</sup>。因此,啤酒和麦汁生产中糖类化合物的控制和检测对于啤酒产品优化生产和质量控制具有重要的意义。

目前糖的测定方法主要有高效毛细管电泳法<sup>[2]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[3]</sup>、分光光度法<sup>[4-6]</sup>、连续流动分析<sup>[7]</sup>和气相色谱法<sup>[8-10]</sup>,但大多数方法都必须将糖衍生化后才能检测,因此操作较麻烦,而且存在一定的分析误差。HPLC与示差折光检测联用曾在糖分析领域中广泛应用,但它也受到灵敏度低、专一性差和不兼容梯度淋洗色谱的限制。柱前衍生HPLC-紫外检测方法因操作费时和灵敏度低而受到限制。蒸发光散射检测器的选择性差且灵敏度低,其检出限仅达到ng数量级<sup>[11,12]</sup>。

近年来,由于高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培法(HPAEC-PAD)在强碱性条件下具有灵敏度高、操作简单、有机溶剂兼容以及无需衍生等优势,在对样品中碳水化合物、氨基酸和其他生物大分子、小分子以及抗生素等的分析方面已有广泛的应用。目前HPAEC-PAD也已经广泛应用于各类样品中糖类的分析领域,但值得注意的是,这些应用主要是检测单糖和二糖<sup>[13-16]</sup>,而关于这种方法在单糖、二糖及低聚糖的同时分析方面的研究还少见报道。本研究使用CarboPac PA100阴离子交换柱,将积分安培检测直接应用到11种糖类包括多种低聚糖的同时检测中,11种糖类在40 min内达到良好的分离,并且对几种糖的检测限都达到了pg级,实际样品中大部分糖类的加标回收率为81%~107%。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

ICS-3000多功能色谱装置(美国Dionex公司),包括双泵(DP)模块、检测器/色谱(DC)模块、自动进样器(AS)模块。双泵模块中包含一个单元泵和一个四元梯度泵,其中四元梯度泵用于糖的分离;检测器/色谱模块中配置进样阀、分析柱和安培检测器;温度均设为30℃;安培检测器用金工作电极、pH-Ag/AgCl复合参比电极、钛对电极。Chromeleon 6.7色谱工作站;超纯水设备(Barnstead公司,美国)。

糖标准样品:葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、异麦芽糖、麦芽三糖、异麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖、麦芽七糖购自Sigma公司。无水醋酸钠(Dionex公司)和50%(质量分数)NaOH溶液(Alfa Aesar公司)。实验用水均为电阻率不低于18.2

MΩ·cm的去离子水。

### 1.2 溶液的制备

#### 1.2.1 标准溶液

为防止因微生物生长而改变标准溶液浓度,用20 mg/L NaN<sub>3</sub>水溶液配制糖的标准溶液。糖的标准储备液均配制成质量浓度为1 g/L的溶液。逐级用20 mg/L NaN<sub>3</sub>水溶液稀释得到工作溶液。

#### 1.2.2 淋洗液

为防止淋洗液吸收空气中的CO<sub>2</sub>,淋洗液配制完毕后应立即在淋洗液瓶上施加大约41.34~55.12 kPa(6~8 psi)的氮气进行保护。

0.25 mol/L NaOH溶液:取50% NaOH溶液13.1 mL,用去离子水稀释至1 L。通氮气保护前尽量避免振荡。

1 mol/L NaAc溶液:称取82.0 g固体无水乙酸钠,用水溶解并稀释为1 L,经0.22 μm尼龙滤膜过滤后使用。

### 1.3 色谱条件

色谱柱:CarboPac PA-100阴离子交换柱,包括分离柱(2 mm × 250 mm)和保护柱(2 mm × 50 mm);柱温30℃;进样体积25 μL;以0.25 mol/L NaOH、1 mol/L NaAc和水为淋洗液进行三元梯度淋洗,流速0.25 mL/min,淋洗条件见表1。

表1 糖的梯度淋洗条件

Table 1 Chromatographic gradient elution conditions for the separation of sugars

Time/ min	φ(H <sub>2</sub> O)/ %	φ(0.25 mol/L NaOH)/%	φ(1 mol/L NaAc)/%	Curve*
0.0	40	60	0	
6.0	40	60	0	
65.0	0	60	40	6
65.1	40	60	0	6
80.0	40	60	0	

\* Shapes of gradient curves are defined in the GS50 Gradient Pump Operator's (Dionex Document No. 031612, Revision 2). Curve 6 is one of the four available convex curves (6-9) with 20% change at approximately 60% of a time segment and 70% change at approximately 90% of the same programmed time segment.

### 1.4 脉冲安培检测条件

糖的四电位脉冲安培检测波形见表2。

表2 糖的电化学检测的四电位波形

Table 2 Detection waveform for sugar detection

Time/s	Potential*/V	Integration
0	0.10	
0.20	0.10	start
0.40	0.10	end
0.41	-2.00	
0.42	-2.00	
0.43	0.60	
0.44	-0.10	
0.50	-0.10	

\* for pH-Ag/AgCl reference electrode.

## 1.5 样品及前处理

青岛啤酒(罐装)购于超市;麦汁样品取自某啤酒厂家。

对样品前处理时,啤酒(先超声脱气 5 min)和麦汁样品均用水稀释 10 倍,过 OnGuard RP 柱(2.5 mL,使用前需先后过 10 mL 甲醇、15 mL 水活化,放置 30 min 后使用)以除去疏水性化合物,弃去前 6 mL 滤液,收集其余的过滤液,待测。如果糖的含量较高,检测时需进一步稀释。

## 2 结果与讨论

### 2.1 11 种糖的分离

糖类的  $pK_a$  一般为 12~14,为弱酸性有机化合物。在强碱性条件下,糖类化合物能形成阴离子,因此可以用阴离子交换色谱柱进行分离。NaOH 中的阴离子  $OH^-$  除了起到淋洗离子的作用之外,其强碱性性质也使安培检测器对糖类有较高的灵敏度,随着 NaOH 浓度的增加,糖类化合物的保留能力降低,但对于强保留的糖(低聚糖等)必须采用具有强淋洗能力的 NaAc 溶液才能洗脱,因此通过优化 NaOH 溶液和 NaAc 溶液的浓度能够改善糖类化合物之间的分离度<sup>[13]</sup>。本文采用水、0.25 mol/L NaOH 溶液、1 mol/L NaAc 溶液三元梯度淋洗方式,11 种糖在 40 min 内可以达到很好的分离(见图 1)。

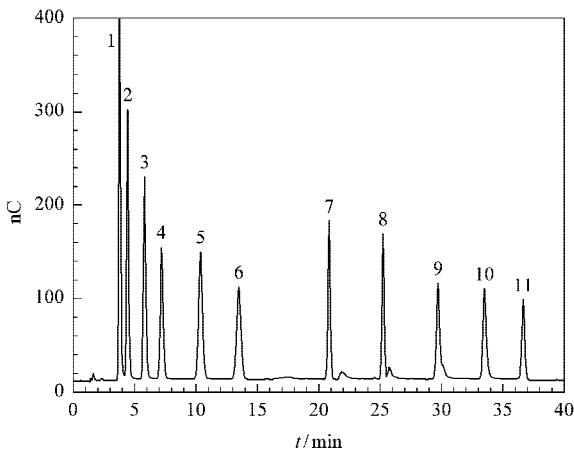


图 1 11 种糖类化合物混合标准溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of 11 sugar standard solution

1. glucose; 2. fructose; 3. isomaltose; 4. sucrose; 5. isomaltotriose; 6. maltose; 7. maltotriose; 8. maltotetraose; 9. maltopentaose; 10. maltohexaose; 11. maltoheptaose.

### 2.2 11 种糖的脉冲安培检测

电化学检测器检测糖的原理是基于糖类化合物结构中的羟基在强碱性条件( $pH > 12$ )下的电化学反应而实现的。糖的电化学检测波形有 3 个发展阶段:直流(恒电位)安培检测、三电位脉冲安培检测

和四电位脉冲安培检测。三电位脉冲安培检测比直流安培法的重现性有了很大的提高,但因为使用氧化电位清洗电极,使电极表面易发生电化学腐蚀和金电极表面的凹陷,随着分析时间的增加糖的峰面积逐渐降低,导致灵敏度下降<sup>[17]</sup>。Rocklin 等<sup>[18]</sup>发展了四电位波形进行糖的脉冲安培检测,四个不同的电位分别用于糖的氧化(糖的检测)、电极还原清洗(使电极表面吸附的氧化产物脱离电极)、电极氧化清洗(使电极表面氧化)和电极表面活化(使电极表面的氧化物还原为电极本身)。该电位波形(见表 2)具有灵敏度高、重现性好的优点,避免了电化学腐蚀和金电极表面出现凹陷现象。

### 2.3 方法的检出限与线性关系

采用表 1 和表 2 的梯度淋洗条件和检测波形,对质量浓度从 0.1 mg/L 到 50 mg/L 的糖混合标准样品进样分析,除麦芽糖和异麦芽糖的线性范围为 0.1~50 mg/L 外,其余各糖的线性范围均为 0.1~20 mg/L,以 3 倍信噪比计算得到的检出限范围为 13~88 pg(见表 3)。

表 3 11 种糖类化合物的检出限及线性关系

Table 3 Limits of detection (LOD) and linearities of 11 sugars

Sugar	LOD/pg ( $S/N=3$ )	Correlation coefficient	Linear range/ (mg/L)
Glucose	13	0.9970	0.1-20
Fructose	23	0.9972	0.1-20
Isomaltose	34	1.0000	0.1-50
Sucrose	47	0.9999	0.1-20
Isomaltotriose	56	0.9983	0.1-20
Maltose	77	0.9992	0.1-50
Maltotriose	40	0.9995	0.1-20
Maltotetraose	48	0.9997	0.1-20
Maltopentaose	68	0.9994	0.1-20
Maltohexaose	74	0.9973	0.1-20
Maltoheptaose	88	0.9980	0.1-20

### 2.4 样品分析

由表 4 可以看出:啤酒中检出了 10 种糖,其中单糖、二糖及异麦芽三糖含量都很低,这和啤酒的低甜度的性质是相符的;麦芽三糖和麦芽四糖的浓度较高,远高于其他糖类。从其色谱图(见图 2)中可以看出,在麦芽四糖至麦芽七糖等 4 种糖的色谱峰之间还有明显的色谱峰出现,且其信号远大于已检出的几种低聚麦芽糖,推测可能是低聚异麦芽糖,但因为缺乏相关的标准样品,未对这几种物质进行定性和定量。

表 4 啤酒和麦汁样品中糖的质量浓度及加标回收率

Table 4 Concentrations and recoveries of sugars in beer and wort samples

Sugar	Beer					Wort				
	content in sample/ (mg/L)	content diluted 200-fold/ (mg/L)	Spiked/ (mg/L)	found/ (mg/L)	recovery/ %	content in sample/ (mg/L)	content diluted 500-fold/ (mg/L)	spiked/ (mg/L)	found/ (mg/L)	recovery/ %
Glucose	21.8	0.11	2.00	1.74	81	7840	3.92 <sup>b)</sup>	5.00	8.64	94
Fructose	17.0	0.09	1.59	1.05	61	1000	2.01	3.92	5.78	96
Isomaltose	558.9	2.79	2.00	4.65	93	186.6	0.37	5.00	5.14	95
Sucrose	172.4	0.86	2.00	2.61	87	1140	2.27	5.00	7.06	96
Isomaltotriose	66.5	0.33	2.00	2.11	89	78.8	0.16	5.00	4.97	96
Maltose	ND	ND	ND	ND	ND	29650	14.82 <sup>b)</sup>	15.00	28.09	88
Maltotriose	4910	6.14 <sup>a)</sup>	10.00	12.31	62	8700	4.35 <sup>b)</sup>	5.00	8.93	92
Maltotetraose	1190	1.49 <sup>a)</sup>	2.00	3.13	82	5370	2.68 <sup>b)</sup>	5.00	7.01	87
Maltopentaose	198.9	0.99	2.00	2.84	92	2190	4.38	5.00	9.04	93
Maltohexaose	76.6	0.38	2.00	2.28	95	2000	4.00	5.00	9.34	107
Maltoheptaose	66.1	0.33	2.00	2.20	93	574.3	1.15	5.00	7.14	95

a) detected and spiked after diluted 800-fold; b) detected and spiked after diluted 2 000-fold. ND: not detected.

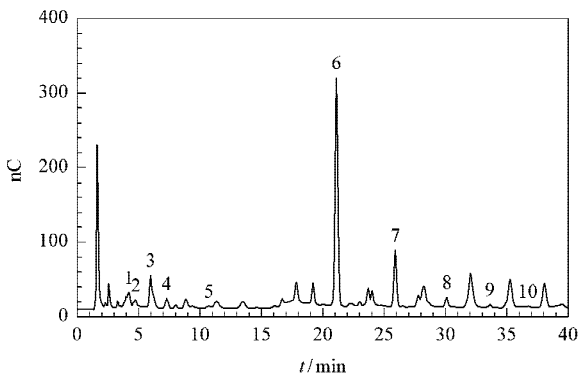


图 2 啤酒样品的色谱图(稀释 100 倍)

Fig. 2 Chromatogram of sugars in diluted beer (100-fold)

1. glucose; 2. fructose; 3. isomaltose; 4. sucrose; 5. isomaltotriose; 6. maltotriose; 7. maltotetraose; 8. maltopentaose; 9. maltohexaose; 10. maltoheptaose.

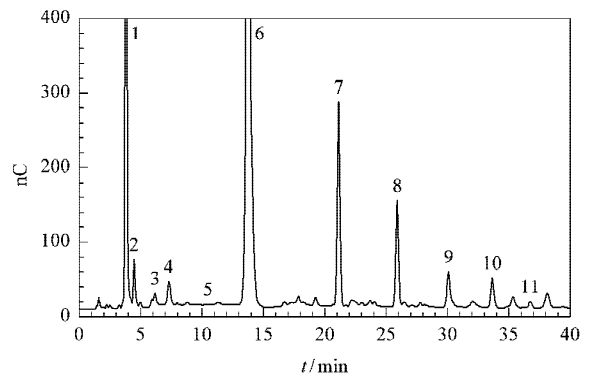


图 3 麦汁样品的色谱图(稀释 500 倍进样)

Fig. 3 Chromatogram of sugars in diluted wort (500-fold)

1. glucose; 2. fructose; 3. isomaltose; 4. sucrose; 5. isomaltotriose; 6. maltose; 7. maltotriose; 8. maltotetraose; 9. maltopentaose; 10. maltohexaose; 11. maltoheptaose.

麦汁中的麦芽糖和低聚糖的含量丰富(见表 4),麦芽糖的质量浓度高达 29 650 g/L,低聚糖的浓度则随着聚合度的增加而递减。样品中还含有少量葡萄糖(质量浓度为 7.84 g/L),果糖、异麦芽糖、蔗糖和异麦芽三糖也都有检出,但浓度较低。

由于在啤酒生产过程中,需要酵母参与作用,因此合理的麦汁组成,特别是糖的组成情况对发酵效果极其重要。麦汁中能被酵母利用的碳源主要是麦芽糖、葡萄糖、果糖、蔗糖和麦芽三糖,为保证发酵的效果,一般将可发酵性糖葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖的比例控制在(10~15):(67~72):(18~22),通过对二者的比例进行适当的调整,增加葡萄糖或麦芽糖的比例,可以提高发酵度<sup>[19]</sup>。本文测定的麦汁样品中 3 种糖的比例是 20:75:22,葡萄糖和麦芽糖所占的比例略高,因此可以实现较好的发酵。麦芽三糖及聚合度较高的低聚糖是在发酵后期才被同化利

用,各种酿造工艺中它们的利用情况差异较大。啤酒中没有检出麦芽糖(见表 4),而葡萄糖和果糖的质量浓度仅为 21.8 mg/L 和 17.0 mg/L,两者与麦芽三糖的比例是 4:3:901,而麦汁中葡萄糖和果糖的质量浓度则达到了 7.84 g/L 和 1.00 g/L,3 种糖的比例约是 8:1:9,这表明啤酒和麦汁之间糖的质量浓度的变化并不仅由于稀释所致,而是单糖和大部分二糖在发酵过程中被酵母所同化或转化,仅有少量存在于最终的产品啤酒中。蔗糖的浓度也明显的不同,麦汁中蔗糖的质量浓度为 1.14 g/L,而啤酒中蔗糖的质量浓度则降至 172.4 mg/L。

麦汁中聚合度为 4~7 的麦芽低聚糖在发酵之后大多数被利用,因此在啤酒中仅有少量被检出,但异麦芽糖的浓度却略有升高,异麦芽三糖的浓度则和麦汁中的浓度相近,这可能是麦汁发酵过程中糖类发生转化所致。相对应的,啤酒中低聚糖之间出

现的未知大色谱峰,推测可能也是由其他低聚糖发生转化产生的低聚异麦芽糖类,但这种可能性尚待考证。

啤酒样品中果糖和麦芽三糖的加标回收都不理想,原因是啤酒中果糖的质量浓度相对较低,仅为 0.09 mg/L,而在同一稀释倍数下,氨基酸的含量较高。利用实验室已经建立的氨基酸分析方法对啤酒中的氨基酸进行检测,发现氨基酸的质量浓度高达 7.09 mg/L,脯氨酸的质量浓度也达到了 1.73 mg/L。由于果糖与氨基酸的洗脱时间相近,再加上基体的影响,造成果糖的加标回收低,麦芽三糖的加标回收低的原因还未知。除此之外,对样品中其他分析物分别进行相应浓度的加标回收,回收率都在 81%~107%(见表 4),说明这种方法对各种糖的测定均有很好的准确度。

参考文献:

[ 1 ] Hughes P S , Baxter E D. Beer quality , safety , and nutritional aspects. Cambridge , UK :The Royal Society of Chemistry , 2001

[ 2 ] Liu S M , Song L N , Zhang T S , et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry ( 刘少民 , 宋立楠 , 张太森 , 等. 分析化学 ) , 2000 , 28( 10 ) : 1 233

[ 3 ] Shi H L , Wang B X , Yang G Y. Chinese Journal of Analytical Chemistry ( 施红林 , 王保兴 , 杨光宇. 分析化学 ) , 2002 , 30( 5 ) : 384

[ 4 ] Zhang L X , Zhang T F , Li L Y. Methods and techniques of biological experiments. Beijing : Higher Education Press ( 张龙翔 , 张庭芳 , 李令媛. 生化实验方法和技术. 北京 : 高等教

育出版社 ) , 1981 : 5

[ 5 ] GB5009. 8-85

[ 6 ] Li Q L. Production analysis of soap and glycerol. Beijing : China Light Industry Press ( 李秋良. 肥皂和甘油的生产分析. 北京 : 中国轻工业出版社 ) , 1985 : 106

[ 7 ] Qu X Z , Xu Z Q , Cheng T , et al. Tobacco Science & Technology/Tobacco Chemist ( 瞿先中 , 徐志强 , 程涛 , 等. 烟草科技/烟草化学 ) , 2005( 11 ) : 28

[ 8 ] Kelly S D , Rhodes C , Lofthouse J H , et al. J Agric Food Chem , 2003 , 51( 7 ) : 1 801

[ 9 ] Xue L H. Chinese Journal of Analytical Chemistry ( 薛连海. 分析化学 ) , 2003 , 31( 3 ) : 382

[ 10 ] Zhou X , Wang S H. Strait Pharmaceutical Journal ( 周欣 , 王松华. 海峡药学 ) , 2001 , 13( 4 ) : 48

[ 11 ] Yang J , Liu J S , Cai J B , et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry ( 杨俊 , 刘江生 , 蔡继宝 , 等. 分析化学 ) , 2005 , 33( 11 ) : 1 596

[ 12 ] Sun Y A , Wang G Q , Zhang Y J , et al. Journal of Analytical Science ( 孙雨安 , 王国庆 , 张应军 , 等. 分析科学学报 ) , 2004 , 20( 5 ) : 531

[ 13 ] Cai Y Q , Liu J S , Shi Y L , et al. J Chromatogr A , 2005 , 1 085 : 98

[ 14 ] Hu J , Shen G L , Wen D Q. Chinese Journal of Chromatography ( 胡静 , 沈光林 , 温东奇. 色谱 ) , 2007 , 25( 3 ) : 451

[ 15 ] Wang L , Chen Q Z , Song G X. Chinese Journal of Chromatography ( 王荔 , 陈巧珍 , 宋国新. 色谱 ) , 2006 , 24( 2 ) : 201

[ 16 ] Ou Y F , Yin P H , Zhao L. Chinese Journal of Chromatography ( 欧云付 , 尹平河 , 赵玲. 色谱 ) , 2006 , 24( 4 ) : 411

[ 17 ] Document No. 031824-05 : Combined CarboPac Manual. [ S. l. ] : Dionex Corporation , 2004

[ 18 ] Rocklin R D , Clark A P , Weitzhandler M. Anal Chem , 1998 , 70 : 1 496

[ 19 ] Zhang H S. Liqueur-Making Science & Technology ( 张和笙. 酿酒科技 ) , 1997( 1 ) : 50

会议通知

第十七届全国色谱学术报告会第一轮通知

由中国化学会色谱专业委员会和中国色谱学会共同组织的全国色谱学术报告会暨仪器展览会一直是国内色谱领域学术水平最高、规模最大的学术报告会及展览会,每两年一次,自 1977 年以来已连续举行十六届。“第十七届全国色谱学术报告会及仪器展览会”定于 2009 年 4 月举行,会期 3 天。筹备工作正在紧张进行中。详细的征稿通知将在会议网站 <http://www.402.dicp.ac.cn> 和下期《色谱》公布,敬请关注。相关信息也可咨询中国色谱学会办公室:0411-84379520(电话/传真),hx18110@126.com(e-mail)。

中国化学会色谱专业委员会  
中国色谱学会  
2008 年 9 月 8 日