

Ионная хроматография: универсальная методика для анализа пива

ВВЕДЕНИЕ

Ионная хроматография - эффективная методика для качественного и количественного определения ионов в растворах. Хотя для анализа пива используются многие методики - включая газовую хроматографию, ВЭЖХ и методы мокрой химии - ионная хроматография быстро становится предпочтительным методом.

Диапазон компонентов, представляющих интерес для производства пива - от неорганических ионов, органических кислот, и горечи хмеля, определяющего общий вкус и горечь напитка - до протеинов, углеводов, и спиртов, анализ на которые проводится, чтобы определить длительность брожения. Готовое пиво может быть проанализировано на определение концентрации добавленных консервантов и красителей, для дополнительного гарантирования соблюдения производственной технологии.

Первый шаг в производстве пива - это процесс замачивания ячменя, или иногда другого зерна, в теплой воде. Присутствующие в ячмене ферменты перерабатывают крахмал в зернах, производя при этом по большей части глюкозу, мальтозу и другие олиго- и полисахариды. Этот процесс называется размягчением и в результате получается сладкое сусло. Сладкое сусло затем смешивается с хмелем и получается хмелевое сусло. При добавлении дрожжей сахара бродят и производят спирт. Из-за различия концентраций, химического поведения, диапазона молекулярных масс различных компонентов в пиве их выделение и определение - очень

трудная задача. Ионная хроматография, использующая полимерные смолы, обеспечивает мониторинг многих из этих компонентов во время пивоварения и в готовом продукте.

Эта методика описывает использование ионообменной и ионо-эксклюзионной хроматографии для определения пяти классов компонентов, представляющих интерес для производства пива, включая: Углеводы, спирты, органические кислоты, неорганические анионы и неорганические катионы. Для детектирования используются импульсный электрохимический или кондуктометрический детекторы.

ОБОРУДОВАНИЕ

Хроматографическая система Dionex, состоящая из:

- градиентного насоса
- хроматографического блока
- электрохимического (пульсирующего ампероматрического) детектора с кондуктометрической ячейкой
- органайзера элюента
- программного обеспечения Chromeleon

РЕАГЕНТЫ И СТАНДАРТЫ

Деионизованная вода, 17.8 МΩ·см и выше;

Угледный анализ

Ацетат натрия (Sigma)

Раствор гидроксида натрия, 50% (w/w)
(Fisher Scientific)

Анализ анионов

Раствор гидроксида натрия, 50% (w/w)
(Fisher Scientific)

Метанол (EM Science)

Анализ спитов

Хлорная кислота (Fisher Scientific)

Анализ катионов

Метансульфоновая кислота (Fluka Chemika-BioChemika)

Анализ органических кислот

0.1 М Тетрабутиламмоний гидроксид (ТВАОН)

(Dionex P/N 39602)

Гептафторбутиловая кислота (Fluka Chemika-BioChemika)

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ И СТАНДАРТОВ

1.0 М Натрий ацетат

Взвесить 82.0 г ангидрида натрия ацетата и поместить в 1-л мерную колбу. Добавить приблизительно 600 мл 17.8 МΩ·см деионизованной воды и перемешивать до растворения. После полного растворения соли, довести до метки деионизованной водой 17.8 МΩ·см. Отфильтровать готовый раствор через 0.2-мкм фильтр.

500 mM Натрий гидроксид

Взвесить 974 г (974 мл) 17.8 МΩ·см деионизованной воды в бутылке для элюента. Дегазировать воду приблизительно 10 мин. Поставить бутылку на весы и взвесить в нее 40.0 г (26.2 мл) 50% (w/w) раствора гидроксида натрия. Быстро перенести бутылку на прибор и загерметизировать гелием. (В современных системах используется генератор элюента, исключаяющий эту процедуру).

100 mM Натрий гидроксид

Взвесить 992 г (992 мл) 17.8 МΩ·см деионизованной воды в бутылке для элюента. Дегазировать приблизительно 18 мин. Взвесить бутылку с водой и аттарировать, отвесить туда 8.00 г (5.25 мл)

50% (w/w) гидроксида натрия. Быстро закрыть крышкой и подать гелий в бутылку.

1.00 mM Натрий гидроксид

Взвесить 990 г (990 мл) 17.8 МΩ·см деионизованной воды в бутылке для элюента. Дегазировать приблизительно 18 мин. Влить туда 10.0 мл 100 mM раствора гидроксида натрия. Быстро закрыть крышкой и подать гелий в бутылку.

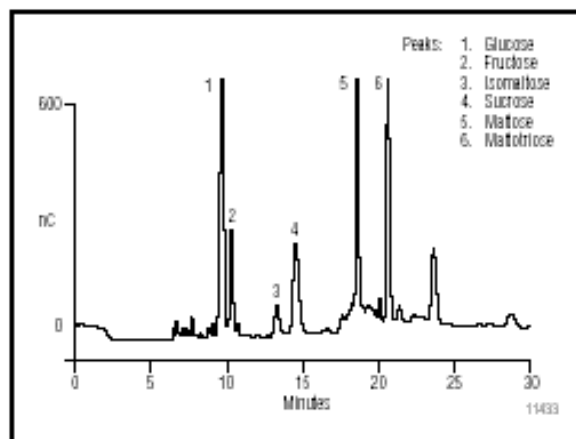


Рис. 1 Разделение сахаров в сусле методом ионообменной хроматографии с детектированием на пульсирующем амперометрическом детекторе. Экспериментальные условия перечислены в Табл. 2. Образец разбавлен 1:10 перед инъекцией.

100 mM Метансульфоновая кислота

Взвесить 9.61 г метансульфоновой кислоты (MSA). Осторожно перелить в 1-л мерную колбу, содержащую 500 мл деионизованной воды. Довести до метки и тщательно перемешать.

100 mM Хлорная кислота

Разбавить 8.60 мл хлорной кислоты 992 мл

17.8 МΩ·см деионизованной воды.

0.8 mM Гептафторбутиловая кислота

Взять Гептафторбутиловую кислоту (FLUKA), поставляемую в 10.0-мл бутылке. Разбавить содержимое одной такой бутылки в 1.00 L колбе водой для получения 77.2 mM

Исходного раствора. Разбавить 10.4 г этого раствора в 1.00 л мерной колбе для получения 0.800 mM рабочего элюента.

5 mM Тетрабутиламмоний гидроксид

Разбавить 50 мл ион-парного реагента Dionex 0.1 M ТВАОН (P/N 35360) до 1 л 17.8 МΩ·см деионизированной водой. Приготовьте несколько литров регенеранта.

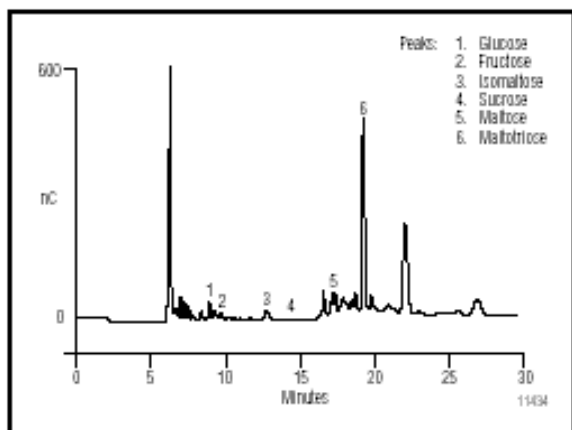


Рис. 2 Разделение моно-, ди- и трисахаридов в американском пиве с помощью ионообменной хроматографии с пульсирующим амперометрическим детектированием. Условия эксперимента перечислены в Табл. 2. Образец разбавлен 1:10 перед инъекцией.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ углеводов

Углеводы и другие вещества, содержащие гидроксильные группы, могут быть детектированы, путем измерения тока при их окислении на золотом электроде. Используется последовательное повторение приложения трех потенциалов, первый для окисления Углеводов, и затем очистки электрода от продуктов реакции окисления приложением большого положительного и затем отрицательного потенциалов. Эта последовательность повторяется каждую секунду для устранения загрязнения электрода и тем самым гарантирует воспроизводимость сигнала. Без этого высота пика будет стабильно уменьшаться, а поверхность электрода загрязнится. Из-за

того, что Углеводы имеют рКа между 12 и 14, они могут быть разделены как анионы методом ионообменной хроматографии. Для проведения реакции окисления на рабочем электроде элюент должен иметь рН 12, при этом смола колонок полимерная и стабильна в диапазоне рН 0-14. Используя гидроксидный градиент, сахара были разделены на колонке следующей последовательности: моносахариды, дисахариды и трисахариды.

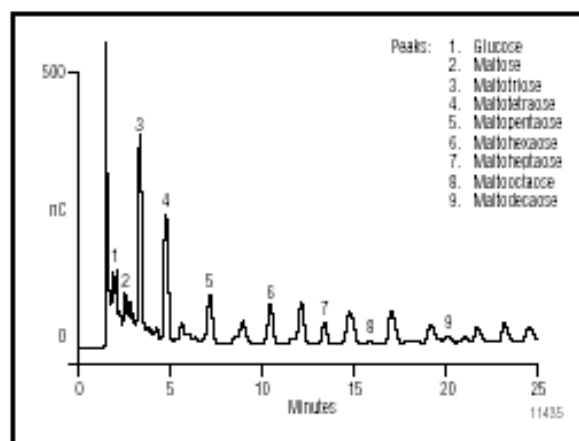


Рис. 3 Разделение мальто-олигосахаридов в американском пиве методом ионообменной с пульсирующим амперометрическим детектированием. Условия эксперимента перечислены в Табл. 3. Образец разбавлен 1:10 перед инъекцией.

Table 1 ED40 waveform for the analysis of carbohydrates by ion chromatography using a gold electrode	
Time (s)	Potential (V)
0.00	0.05
0.40	0.05
0.41	0.75
0.60	0.75
0.61	-0.15
1.00	-0.15

Условия разделения для хроматограмм, представленных на рисунках 1 и 2, показаны в табл. 2. Углеводы - наиболее важные в пивном производстве ферментные сахара. В основном сахара больше чем DP3 не

бродят; однако, они вносят вклад в цвет и общий аромат пива и являются главными.

Table 2 Experimental conditions for the separation of mono-, di-, and trisaccharides in beer and wort by ion-exchange chromatography

Column:	CarboPac PA1			
Eluent 1:	Deionized water			
Eluent 2:	500 mM Sodium hydroxide			
Gradient:	<u>Time</u>	<u>E1</u>	<u>E2</u>	<u>Comments</u>
	Initial	99	1	Reequilibrate
	5.00	99	1	Inject
	6.00	99	1	Back to Load
	20.00	91	9	
	45.00	0	100	
	50.00	0	100	
Flow Rate:	1.0 mL/min			
Inj. Volume:	10 μ L			
Detection:	Pulsed amperometry, gold electrode (see Table 1 for waveform)			

На рисунке 1 показано разделение бродильных сахаров (< DP3) в пробе хмелевого суслу. Эти сахара превращаются в спирт. Если сравнить рисунок с разделением, показанным на рис. 2., то отличие между готовым пивом и пивом в процессе производства очевидно. Как и ожидалось, концентрация бродильных сахаров в сусле выше, чем в готовом пиве. Сложные сахара, крахмал и декстрины разлагаются ферментами и образуют сусло с высоким брожением, состоят из глюкозных элементов. Мальтоза простейший из сложных сахаров образован двумя молекулами глюкозы соединенных 1,4 связями. Приняты названия в соответствии с числом единиц глюкозы связанных в сложных сахарах. Так малтотетроза (DP4), например, состоит из 4-х молекул глюкозы связанных 1,4 связями. Рисунок 3 показывает разделение мальтозных олигосахаридов от DP3 до DP10. Великолепное разделение олигомеров мальтозы вплоть до DP15 возможно, благодаря быстрому профилю градиента. Элюент содержит ацетат натрия с добавлением гидроксида натрия. Ацетат натрия увеличивает силу элюента, что приводит к уменьшению времени удерживания олигосахаридов. Разделение

возможно и без ацетата натрия, но время анализа очень долгое.

Table 3 Experimental conditions for the separation of oligosaccharides in beer using the CarboPac PA-100

Column:	CarboPac PA-100				
Eluent 1:	Deionized water				
Eluent 2:	500 mM Sodium hydroxide				
Eluent 3:	1 M Sodium acetate				
Gradient:	<u>Time</u>	<u>E1</u>	<u>E2</u>	<u>E3</u>	<u>Comments</u>
	Initial	57	33	10	Reequilibrate
	1.50	57	33	10	Inject
	6.50	57	33	10	Gradient Start
	31.50	42	33	25	Gradient End
Flow Rate:	1.0 mL/min				
Inj. Volume:	10 μ L				
Detection:	Pulsed amperometry, gold electrode (see Table 1 for waveform)				

Анализ спиртов

Обычно только два спирта присутствуют в высокой концентрации в пиве - это этанол и глицерин. Глицерин - важный компонент в пиве, он значительно больше чем глюкоза влияет на аромат и сладость.

Этанол и глицерин могут быть разделены методом ион-эксклюзионной хроматографии с последующим импульсным амперометрическим детектированием. Рисунок 4 показывает разделение этанола и глицерина в пиве.

Table 4 ED40 waveform for the analysis of alcohols by ion-exclusion chromatography using a platinum electrode

Time (s)	Potential (V)
0.00	0.30
0.05	0.30
0.25	0.30
0.26	1.25
0.60	1.25
0.61	0.10
1.00	0.10

Table 5 Experimental conditions used for the separation of glycerol and ethanol by ion-exclusion chromatography using the IonPac ICE-AS6 column

Column:	IonPac® ICE-AS6
Eluent:	100 mM Perchloric acid
Flow Rate:	2.0 mL/min
Inj. Volume:	10 µL
Detection:	Pulsed amperometry, platinum electrode (see Table 4 for waveform)

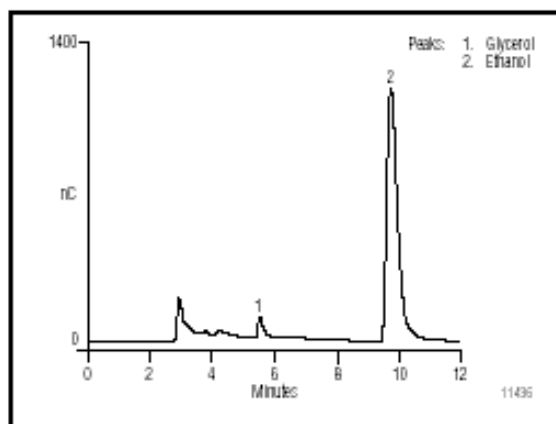


Рис. 4 Разделение этанола и глицерина в американском пиве методом ион-эксклюзионной хроматографии с пульсирующим амперометрическим детектированием. Условия эксперимента перечислены в Табл. 5. Образец разбавили 1:10 перед инъекцией.

Анализ органических кислот

Определение органических кислот во всех фазах производства пива может помочь для контроля метаболитов брожения и коррекции вкуса пива. Один из методов разделения органических кислот - ион-эксклюзионная хроматография с кондуктометрическим детектированием. Колонка ICE-AS6 разработана для эффективного разделения алифатических органических кислот с низким молекулярным весом, а также алифатических спиртов и гликолей. Используемый механизм разделения, ионизированных частиц основан на различии их рКа. Сильные неорганические кислоты не удерживаются на стационарной фазе.

Table 6 Experimental conditions for the separation of organic acids in beer by ion-exclusion chromatography using the IonPac ICE-AS6 column

Column:	IonPac ICE-AS6
Eluent:	0.8 mM Heptafluorobutyric acid
Flow Rate:	1.0 mL/min
Inj. Volume:	25 µL
Detection:	Suppressed conductivity, AMMS™-ICE
Regenerant:	5 mM Tetrabutylammonium hydroxide at 5 mL/min

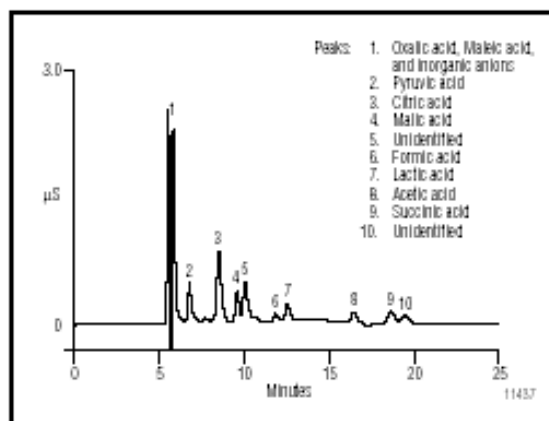


Рис. 5 Разделение органических кислот в британском крепком пиве.

Условия эксперимента перечислены в Табл. 5. Образец был разбавлен 1:40 перед инъекцией.

На рисунке 5 показано разделение серии органических кислот в портере. Перед дозированием проба была разбавлена 1:40 и дегазирована. Щавелевая и малеиновая кислоты элюируются на "хвосте" "вводного пика" и маскируются сильными анионами такими как фторид и хлорид. Пуриват, цитрат, малат, формат, лактат, ацетат и сукцинат хорошо разделяются. Присутствие ацетата определяется окислением, в то время как пуриват является промежуточным продуктом превращения глюкозы в спирт. Лактат производится бактериями молочной кислоты, что превращает глюкозу и другие сахара в молочную кислот, его содержание минимально в большинстве сортов пива. Несколько не идентифицированных пиков также разделены.

Неорганические анионы

Неорганические анионы, вносимые в пиво с исходной водой, имеют важное влияние на вкус пива. Таким образом, вода может быть контролирована ионной хроматографией для гарантии ее чистоты и состава. Не смотря на преднамеренное добавление высоких концентраций некоторых анионов, таких как сульфат, чрезмерные количества сульфатов и хлоридов могут ухудшить вкус пива. Вдобавок, высокие концентрации таких анионов как нитрат (если он превращается в нитрит) могут повредить дрожжи в процессе брожения. Следовательно, мониторинг анионного состава важный шаг в производстве пива.

Неорганические анионы разделяются на анионообменной колонке и определяются кондуктометрическим детектором. Для эффективного градиентного элюирования используется гидроксид вместо карбоната из-за низкой электропроводности гидроокиси.

На рисунке 6 показано одновременное разделение смеси органических и неорганических кислот в Американском эле. Перед дозированием проба разбавлялась 1:40. Концентрация гидроксида натрия в элюенте 2 достаточно слаба, чтобы разделить фторид и слабоудерживаемые моновалентные органические кислоты. Добавление метанола в элюент меняет селективность колонки для более гидрофобных анионов, и позволяет увеличить разделение сукцината и малата а также тартрата и малеата, которые в противном случае выходят одним пиком. Таким образом, можно разделять не только анионы сильных кислот, то также различные органические кислоты.

Воспроизводимость метода 0.5% для времен удерживания и 2% для площадей пиков при хорошей линейности детектирования ($R^2 = 0.999$) в диапазоне 1.5 порядка. Первый неорганический анион фторид, часто добавляют в водопроводную воду, чтобы предохранить разрушение зубов,

он безвреден для пивоварения. Хлорид элюируется вторым, и на уровнях выше 250 мг/л его присутствие увеличивает сладость пива. Тем не менее, он может также препятствовать дрожжевой флокуляции.

Table 7 Experimental conditions for the separation of inorganic anions in beer using the IonPac AS11 column

Column:	IonPac AS11 Analytical (4 mm) IonPac AG11 Guard (4 mm) IonPac ATC-1 Anion Trap																														
Eluent 1:	Deionized water																														
Eluent 2:	1 mM Sodium hydroxide																														
Eluent 3:	100 mM Sodium hydroxide																														
Eluent 4:	Methanol																														
Gradient:	<table border="1"><thead><tr><th>Time</th><th>E1</th><th>E2</th><th>E3</th><th>E4</th></tr></thead><tbody><tr><td>Initial</td><td>80</td><td>20</td><td>—</td><td>—</td></tr><tr><td>3.00</td><td>80</td><td>20</td><td>—</td><td>—</td></tr><tr><td>5.00</td><td>66</td><td>20</td><td>—</td><td>14</td></tr><tr><td>18.00</td><td>42</td><td>—</td><td>38</td><td>20</td></tr><tr><td>18.01</td><td>80</td><td>20</td><td>—</td><td>—</td></tr></tbody></table>	Time	E1	E2	E3	E4	Initial	80	20	—	—	3.00	80	20	—	—	5.00	66	20	—	14	18.00	42	—	38	20	18.01	80	20	—	—
Time	E1	E2	E3	E4																											
Initial	80	20	—	—																											
3.00	80	20	—	—																											
5.00	66	20	—	14																											
18.00	42	—	38	20																											
18.01	80	20	—	—																											
Flow Rate:	2 mL/min																														
Inj. Volume:	25 μ L																														
Detection:	Suppressed conductivity, ASRS™, AutoSuppression™ recycle mode																														

Нитрат раньше рассматривался, как проблема для процесса пивоварения, но оказалось что проблема в нитрите, который получается из нитрата, и влияет на дрожжевой метаболизм, а также вызывает слабое или незаконченное брожение. Сульфат присутствует в природной воде, но наделяет хорошее хмельное пиво острым, сухим привкусом и, следовательно, поддерживается на минимуме. Наконец, фосфат присутствует в солоде и буферизует мезиво в немного кислое рН.

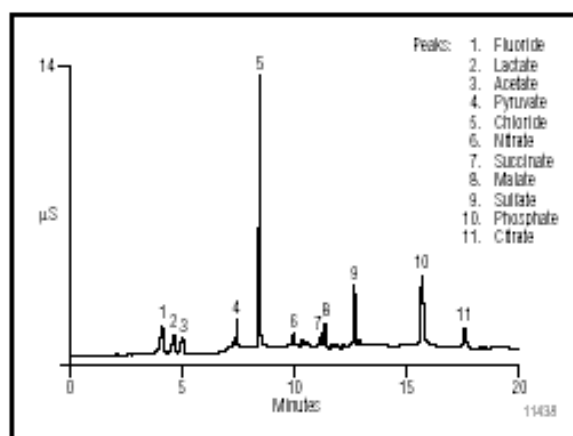


Рис. 6 Разделение неорганических анионов и органических кислот в американском эле

Методом ионообменной хроматографии. Экспериментальные условия перечислены в Табл. 6. Образец разбавили 1:40 перед инъекцией.

Table 8 Experimental conditions for the separation of inorganic cations in beer using the IonPac CS12 column					
Column:	IonPac CS12 Analytical (4 mm) IonPac CG12 Guard (4 mm) IonPac CTC-1 Cation Trap				
Eluent 1:	Deionized water				
Eluent 2:	100 mM Methanesulfonic acid				
Gradient:	Time	E1	E2	E3	E4
	Initial	84	16	—	—
	5.00	84	16	—	—
	5.01	60	40	—	—
	10.00	60	40	—	—
	10.01	84	16	—	—
Flow Rate:	1.0 mL/min				
Inj. Volume:	25 μ L				
Detection:	Suppressed conductivity, CSRS™, AutoSuppression recycle mode				

Неорганические катионы

Как и в случае с неорганическими анионами, большинство неорганических катионов попадает в пиво с исходной водой. Четыре наиболее распространенных катиона в пиве - это натрий, калий, кальций и магний.

Некоторые из них влияют на pH мescива, в то время как другие влияют на вкус пива. Другие металлы, такие как свинец, медь и цинк также контролируются с целью гарантировать их отсутствие, поскольку они ядовиты даже в незначительных количествах. Эта методика фокусирует внимание на щелочных и щелочно-земельных металлах. Неорганические катионы разделяются методом ионообменной хроматографии с кондуктометрическим детектированием, градиент позволяет разделять барий и стронций в дополнение к пяти катионам, показанным на рис. 7. Переход на 5 мин от более слабого к сильному элюенту позволяет сузить пики для двухвалентных катионов.

Воспроизводимость метода 0.5% по времени и 2% по площадям пиков.

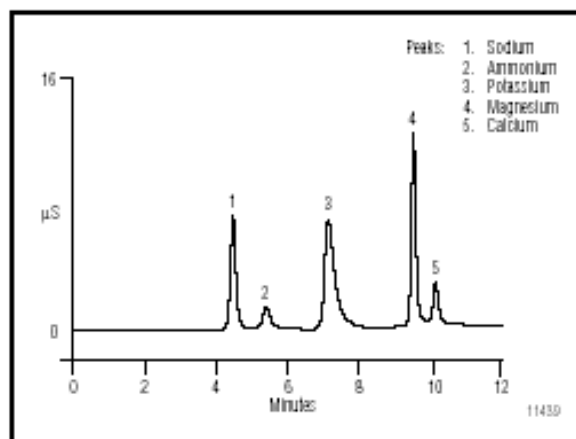


Рис. 7 Разделение неорганических катионов в разбавленном 1:40 американском лагерном пиве методом ионообменной хроматографии с использованием колонки IonPac CS12. Условия эксперимента перечислены в Табл. 8.

Линейность великолепная (два порядка для магния) при коэффициенте корреляции $r^2 = 0.999$, для всех компонентов кроме аммония. Если нет необходимости контролировать барий и стронций, то условия можно изменить и анализировать пять катионов, показанных на рис. 7 в изократическом режиме за 10 мин.

На Рис. 7 показано разделение основных катионов в пиве. Проба была дегазирована и разбавлена перед инъекцией 1:40. Натрий элюируется первым. При концентрации 75-150 мг/л, он дает солоноватость пиву, когда связывается с хлоридом. Если также много сульфата, натрий придает неприятную резкость во вкусе. Калий элюируется следующим, и подобно натрию придает пиву слегка соленый вкус. Он также может тормозить действие некоторых ферментов в мescиве. Магний - важное питательное вещество для дрожжей на уровнях около 10-20 мг/л, но наделяет пиво острым, горько-кислым вкусом на уровнях значительно выше чем 20 мг/л.

Кальций - наиболее важный металл, однако его реакция с фосфатом в солоде уменьшает рН месива и сусла. Он также помогает действию ферментов, но не влияет на вкус.

Sigma Chemical Company, P.O. Box
14508, St. Louis,
Missouri, 63178, USA, 1-800-325-3010.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Углеводы, спирты, органические кислоты, неорганические анионы и катионы могут быть разделены на ионообменных или ион-эксклюзионных колонках и определены на импульсном амперометрическом или кондуктометрическом детекторах. Хотя многие из этих компонентов можно определить индивидуально, используя независимые аналитические методики, малое время анализа и меньшие затраты на анализ могут достигаться при использовании многофункциональных способностей ионных хроматографов. Ионная хроматография - универсальная методика для решения многих аналитических задач возникающих в процессе пивоварения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

EM Science, P.O. Box 70, 480 Democrat
Road,
Gibbstown, New Jersey, 08027, USA,
1-800-222-0342.
Fisher Scientific, 711 Forbes Ave.,
Pittsburgh,
Pennsylvania, 15219-4785, USA, 1-800-
766-7000.
Fluka Chemika-BioChemika, Fluka Chemie
AG,
Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs,
Switzerland, +81
755 25 11.

Ion Chromatography: A Versatile Technique for the Analysis of Beer

INTRODUCTION

Ion chromatography is an efficient technique for the analysis and quantification of ions in solution. Although there are several techniques that have been used for the analysis of beer — including gas chromatography, HPLC, enzyme-based methods, and wet chemical methods — ion chromatography is rapidly becoming the method of choice.

The compounds of interest for the beer industry range — from inorganic ions, organic acids, and hop bittering principles that contribute to the overall taste and bitterness of the beverage — to proteins, carbohydrates, and alcohols that are monitored to determine the extent of fermentation. The finished beer product may be analyzed to determine the concentration of added preservatives and colorants, in addition to ensuring manufacturing authenticity.

The first step in the beer making process involves soaking barley, and sometimes other grains, in warm water. Enzymes present in the barley break down starch from the grains, producing mostly glucose, maltose, and other oligo- and polysaccharides. This process is called mashing, and the resulting solution is called sweet wort. The sweet wort is then treated with hops, thereby producing hopped wort. Yeast is added and the smaller saccharides are fermented to produce alcohol. Because of the different concentrations, chemical behavior, and molecular mass ranges of the various components in beer, their isolation and determination can be difficult. Ion chromatography, using polymer-based resins, provides a means to monitor many of these important compounds during the brewing process and in the final product.

This application note describes the use of ion-exchange or ion-exclusion chromatography for the determination of five classes of compounds of interest to the brewing industry, including: carbohydrates, alcohols, organic acids, inorganic anions, and inorganic cations. One of two forms of electrochemical detection is used, pulsed amperometry or conductivity detection.

EQUIPMENT

A Dionex chromatographic system consisting of:

- Gradient Pump
- Chromatography Enclosure
- Electrochemical Detector with pulsed amperometry and conductivity modes
- Eluent Organizer

PeakNet Chromatography Workstation

REAGENTS AND STANDARDS

Deionized water, 17.8 M Ω -cm or better

Carbohydrate Analysis

Sodium acetate (Sigma)
Sodium hydroxide solution, 50% (w/w)
(Fisher Scientific)

Anion Analysis

Sodium hydroxide solution, 50% (w/w)
(Fisher Scientific)
Methanol (EM Science)

Alcohol Analysis

Perchloric acid (Fisher Scientific)

Cation Analysis

Methanesulfonic acid (Fluka Chemika-BioChemika)

Organic Acid Analysis

0.1 M Tetrabutylammonium hydroxide (TBAOH)
(Dionex P/N 39602)

Heptafluorobutyric acid (Fluka Chemika-BioChemika)

PREPARATION OF SOLUTIONS AND REAGENTS

1.00 M Sodium Acetate

Weigh out 82.0 g of anhydrous sodium acetate and place into a 1-L volumetric flask. Add approximately 600 mL of 17.8 M Ω -cm deionized water and swirl to dissolve.

When the salt has dissolved completely, fill up to the mark with 17.8 M Ω -cm deionized water. Filter the resulting solution through a 0.2- μ m filter.

500 mM Sodium Hydroxide

Weigh 974 g (974 mL) of 17.8 M Ω -cm deionized water into an eluent reservoir bottle. Degas the water for approximately 10 minutes. Tare the bottle on the balance and add 40.0 g (26.2 mL) of 50% (w/w) sodium hydroxide directly to the bottle. Quickly transfer the eluent bottle to the instrument and pressurize it with helium.

100 mM Sodium Hydroxide

Weigh 992 g (992 mL) of 17.8 M Ω -cm deionized water into an eluent reservoir bottle. Degas the water for approximately 10 minutes. Tare the bottle on the balance and add 8.00 g (5.25 mL) of 50% (w/w) sodium hydroxide directly to the bottle. Quickly transfer the eluent bottle to the instrument and pressurize it with helium.

1.00 mM Sodium Hydroxide

Place 990 g (990 mL) of 17.8 M Ω -cm deionized water into an eluent reservoir bottle. Degas the water for approximately 10 minutes. Pipette 10.0 mL of the 100 mM sodium hydroxide solution directly into the bottle. Quickly transfer the eluent bottle to the instrument and pressurize it with helium.

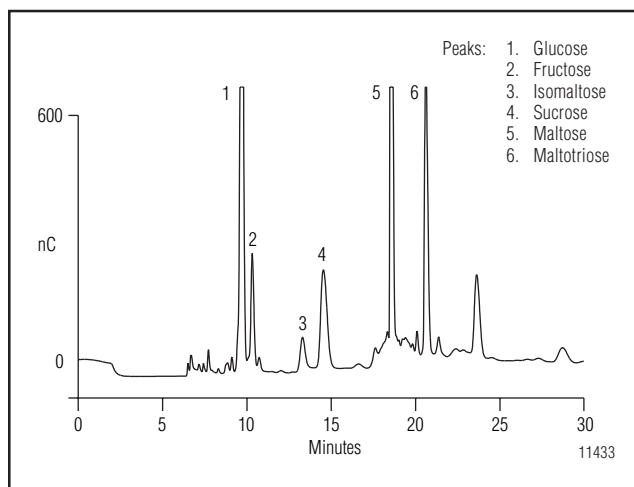


Figure 1 Separation of fermentable sugars in wort by ion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Experimental conditions are listed in Table 2. The sample was diluted 1:10 before injection.

100 mM Methanesulfonic Acid

Weigh out 9.61 g of methanesulfonic acid (MSA). Carefully add this amount to a 1-L volumetric flask containing about 500 mL of deionized water. Dilute to the mark and mix thoroughly.

100 mM Perchloric Acid

Dilute 8.60 mL of perchloric acid into 992 mL of 17.8 M Ω -cm deionized water.

0.8 mM Heptafluorobutyric Acid

Heptafluorobutyric acid (perfluorobutyric acid) is supplied by FLUKA in 10.0-mL bottles. Dilute the entire contents of one 10.0-mL bottle in 1.00 L to obtain a 77.2 mM stock solution. Dilute 10.4 g of the stock solution in 1.00 L to obtain the 0.800 mM working eluent.

5 mM Tetrabutylammonium Hydroxide

Dilute 50 mL of the Dionex 0.1 M TBAOH ion-pairing reagent (P/N 35360) to 1 L with 17.8 M Ω -cm deionized water. Prepare several liters of the regenerant.

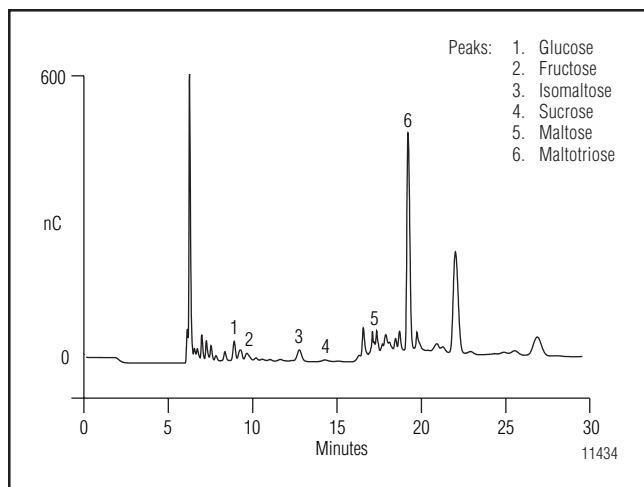


Figure 2 Separation of mono-, di-, and trisaccharides in an American beer by ion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Experimental conditions are listed in Table 2. The sample was diluted 1:10 before injection.

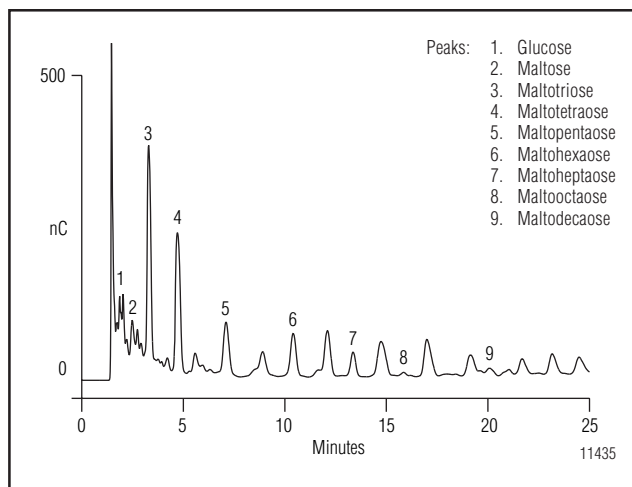


Figure 3 Separation of malto-oligosaccharides in an American beer by ion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Experimental conditions are listed in Table 3. The sample was diluted 1:10 before injection.

RESULTS AND DISCUSSION

Carbohydrate Analysis

Carbohydrates and other species containing hydroxyl functional groups can be detected by measuring the current caused by their oxidation at a gold electrode. A repeating sequence of three applied potentials is used first to oxidize the carbohydrates, and then to clean the electrode of the products of the oxidation reaction by applying a large positive and then a negative potential. This sequence is repeated once every second to eliminate electrode fouling and thereby to ensure a reproducible response. Unless this sequence is performed, the peak heights will steadily decrease as the electrode surface becomes fouled. For the chromatograms shown in Figures 1, 2, and 3, the electrochemical detector was programmed with the waveform shown in Table 1. Integration was performed from 0.2 to 0.4 seconds. Other waveforms that have been developed and tested are described in *Technical Note 21, "Optimal Settings for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Using Dionex Pulsed Electrochemical and Amperometric Detectors,"* and may provide superior results in some cases.

Because carbohydrates have pK_a s between 12 and 14, they can be separated as anions by ion-exchange chromatography. To drive the oxidation reaction at the working electrode, the eluent must be above pH 12, thus the resins in the Dionex CarboPac™ columns are polymer-based for stability and durability in the pH range 0–14. Using a hydroxide gradient, the sugars are separated on the CarboPac PA1 in the following order: monosaccharides,

Table 1 ED40 waveform for the analysis of carbohydrates by ion chromatography using a gold electrode

Time (s)	Potential (V)
0.00	0.05
0.40	0.05
0.41	0.75
0.60	0.75
0.61	-0.15
1.00	-0.15

Table 2 Experimental conditions for the separation of mono-, di-, and trisaccharides in beer and wort by ion-exchange chromatography

Column:	CarboPac PA1			
Eluent 1:	Deionized water			
Eluent 2:	500 mM Sodium hydroxide			
Gradient:	Time	E1	E2	Comments
	Initial	99	1	Reequilibrate
	5.00	99	1	Inject
	6.00	99	1	Back to Load
	20.00	91	9	
	45.00	0	100	
	50.00	0	100	
Flow Rate:	1.0 mL/min			
Inj. Volume:	10 μ L			
Detection:	Pulsed amperometry, gold electrode (see Table 1 for waveform)			

disaccharides, and trisaccharides. The experimental conditions used for the separations shown in Figures 1 and 2 are presented in Table 2.

The carbohydrates of most importance to the brewing industry are the fermentable sugars. In general, saccharides larger than DP3 are not fermentable; however, they will contribute to the caloric value as well as to the overall flavor of the beer and its ability to form a head. Figure 1 shows the separation of fermentable sugars (\leq DP3) in a hopped wort sample. These are the sugars that are converted by yeast to alcohol. If this figure is compared with the separation shown in Figure 2, the difference between the finished beer and a beer during production is evident. As expected, the concentration of fermentable sugars is greater in the wort than in the final beer product.

The complex sugars, starches, and dextrans, which are broken down by enzymes to produce a wort of high fermentability, are built up from glucose sub-units. Maltose is the simplest of the complex sugars and is formed by two glucose molecules joined together by an α -1,4 linkage. Following convention, chains are named according to the number of glucose units that have been incorporated. Thus, maltotetraose (DP4), for example, is a chain of four glucose units linked together by α -1,4 linkages.

Figure 3 shows the separation of maltose oligosaccharides in beer from DP3 to DP10, using the CarboPac PA-100. Excellent resolution of maltose oligomers up to DP15 is possible, allowing for rapid profiling. As indicated in the experimental conditions listed in Table 3, the eluent contained sodium acetate in addition to sodium hydroxide. The sodium acetate increases the eluent strength, which reduces the retention time of the oligosaccharides. Separation is possible in the absence of sodium acetate, but the run times are prohibitively long.

Alcohol Analysis

Usually, the only two alcohols present in high concentrations in beer are ethanol and glycerol. Glycerol is an important component in beer; it has a considerable effect on flavor and is sweeter than glucose. Ethanol and glycerol can be separated by ion-exclusion chromatography, then detected with pulsed amperometry using the waveform described in Table 4 with integration performed from 0.05 to 0.25 seconds.

Table 3 Experimental conditions for the separation of oligosaccharides in beer using the CarboPac PA-100

Column:	CarboPac PA-100				
Eluent 1:	Deionized water				
Eluent 2:	500 mM Sodium hydroxide				
Eluent 3:	1 M Sodium acetate				
Gradient:	Time	E1	E2	E3	Comments
	Initial	57	33	10	Reequilibrate
	1.50	57	33	10	Inject
	6.50	57	33	10	Gradient Start
	31.50	42	33	25	Gradient End
Flow Rate:	1.0 mL/min				
Inj. Volume:	10 μ L				
Detection:	Pulsed amperometry, gold electrode (see Table 1 for waveform)				

Table 4 ED40 waveform for the analysis of alcohols by ion-exclusion chromatography using a platinum electrode

Time (s)	Potential (V)
0.00	0.30
0.05	0.30
0.25	0.30
0.26	1.25
0.60	1.25
0.61	0.10
1.00	0.10

Table 5 Experimental conditions used for the separation of glycerol and ethanol by ion-exclusion chromatography using the IonPac ICE-AS6 column

Column:	IonPac [®] ICE-AS6
Eluent:	100 mM Perchloric acid
Flow Rate:	2.0 mL/min
Inj. Volume:	10 μ L
Detection:	Pulsed amperometry, platinum electrode (see Table 4 for waveform)

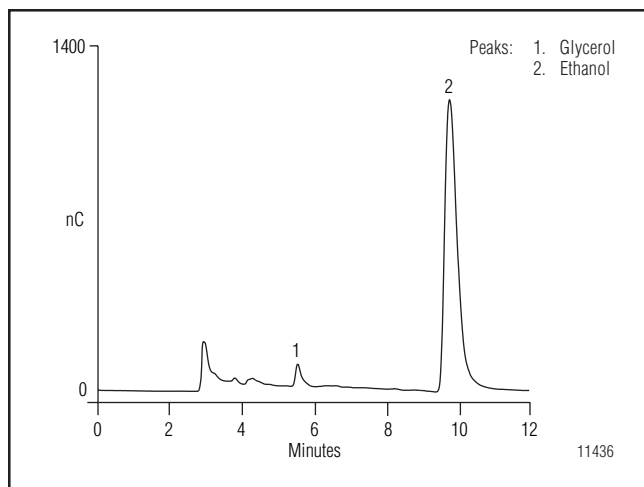


Figure 4 Separation of glycerol and ethanol in an American beer by ion-exclusion chromatography with pulsed amperometric detection. Experimental conditions as listed in Table 5. The sample was diluted 1:10 before injection.

The IonPac ICE-AS6 column is an ion-exclusion column that successfully separates alcohols. The experimental conditions used for the separation of glycerol and ethanol are listed in Table 5. Figure 4 shows the separation of ethanol and glycerol in beer by ion-exclusion chromatography using pulsed amperometric detection with a platinum electrode.

Organic Acid Analysis

The measurement of organic acids, in all phases of beer production, can be used to help track metabolic products of fermentation and to correlate beer flavor trends. One way to separate organic acids is with ion-exclusion chromatography using suppressed conductivity detection. The IonPac ICE-AS6 column is an ion-exclusion column designed for the efficient separation of low molecular weight aliphatic organic acids including hydroxy-substituted organic acids, in addition to species such as aliphatic alcohols and glycols. Using this separation mechanism, weakly ionized species are separated based on differences in their pK_a s. Strong inorganic acid anions are not retained by the stationary phase and elute in the void volume of the column. The standard eluent for use with the IonPac ICE-AS6 is 0.4 mM heptafluorobutyric acid (perfluorobutyric acid). Other monoprotic acids can be used; however, the background conductivity will be higher. The experimental conditions are listed in Table 6.

Table 6 Experimental conditions for the separation of organic acids in beer by ion-exclusion chromatography using the IonPac ICE-AS6 column

Column:	IonPac ICE-AS6
Eluent:	0.8 mM Heptafluorobutyric acid
Flow Rate:	1.0 mL/min
Inj. Volume:	25 μ L
Detection:	Suppressed conductivity, AMMS™-ICE
Regenerant:	5 mM Tetrabutylammonium hydroxide at 5 mL/min

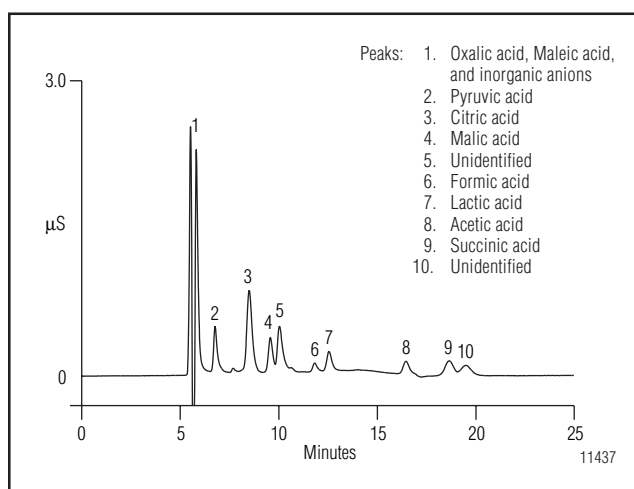


Figure 5 Separation of organic acids in a British stout. Experimental conditions are listed in Table 5. The sample was diluted 1:40 before injection.

Figure 5 shows the separation of a series of organic acids in a stout. The sample was degassed and diluted 1:40 prior to injection. Oxalic and maleic acids are eluted on either side of the ‘water dip,’ masked by strong acid anions such as fluoride and chloride. Pyruvate, citrate, malate, formate, lactate, acetate, and succinate, however, are all baseline resolved. The presence of acetate may provide evidence of oxidation, while pyruvic acid is present as an intermediate product in the conversion of glucose to alcohol. Lactate is produced by lactic acid bacteria that convert glucose and other sugars to lactic acid, so it is kept to a minimum in most beers. A few unidentified peaks are also resolved.

Inorganic Anions

Inorganic anions are introduced into beer from the brewing water and have an important impact on the flavor of beer. Thus, the water can be monitored by ion chromatography to ensure purity and consistency. Despite the deliberate addition of high levels of some anions such as sulfate (Burtonization), excessive amounts of sulfate and chloride, for example, can have a detrimental effect on the flavor of the beer. In addition, high concentrations of other anions such as nitrate (if it is converted to nitrite) can harm the yeast during the fermentation process. Therefore, monitoring the anion profile is an important quality control step in the brewing industry.

Inorganic anions are separated by anion-exchange chromatography and monitored by suppressed conductivity detection; Table 7 lists the experimental conditions. When performing gradient elution on the IonPac AS11 column, a hydroxide eluent system is used instead of a carbonate eluent because of the low background conductivity of hydroxide. An Anion Trap Column (ATC) should be installed between the gradient pump and the injection valve to minimize baseline shifts resulting from the elution of anionic contaminants in the eluent.

Figure 6 shows the simultaneous separation of a mixture of inorganic and organic anions in an American ale using the IonPac AS11 column. The sample was degassed and diluted 1:40 prior to injection. The sodium hydroxide concentration in Eluent 2 is weak enough that not only is fluoride eluted after the void, but several weakly retained monovalent organic acids are also resolved. The addition of methanol to the eluent modifies the selectivity of the column for the more hydrophobic anions, thus allowing resolution between succinate and malate and also between tartrate and maleate, which would otherwise coelute. Thus, using the conditions described in Table 6, it is possible to separate not only the strong acid anions, but also a variety of weak organic acids. To obtain a flat baseline for this chromatogram, the baseline subtraction option in the PeakNet software was used. Reproducibility for this method is on the order of 0.5% or better for retention times and 2% or better for peak areas with good linearity ($r^2=0.999$) over the range tested (1.5 orders of magnitude).

Table 7 Experimental conditions for the separation of inorganic anions in beer using the IonPac AS11 column

Column:	IonPac AS11 Analytical (4 mm) IonPac AG11 Guard (4 mm) IonPac ATC-1 Anion Trap				
Eluent 1:	Deionized water				
Eluent 2:	1 mM Sodium hydroxide				
Eluent 3:	100 mM Sodium hydroxide				
Eluent 4:	Methanol				
Gradient:	Time	E1	E2	E3	E4
	Initial	80	20	—	—
	3.00	80	20	—	—
	5.00	66	20	—	14
	18.00	42	—	38	20
	18.01	80	20	—	—
Flow Rate:	2 mL/min				
Inj. Volume:	25 μ L				
Detection:	Suppressed conductivity, ASRS™, AutoSuppression™ recycle mode				

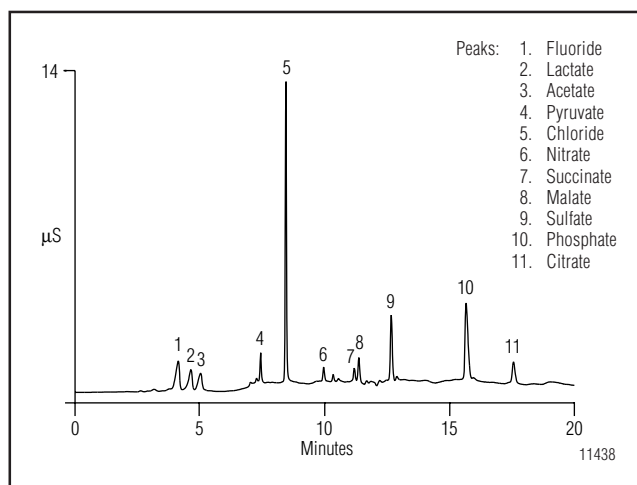


Figure 6 Separation of inorganic anions and organic acids in an American ale by ion-exchange chromatography. Experimental conditions are listed in Table 6. The sample was diluted 1:40 before injection.

Table 8 Experimental conditions for the separation of inorganic cations in beer using the IonPac CS12 column

Column:	IonPac CS12 Analytical (4 mm) IonPac CG12 Guard (4 mm) IonPac CTC-1 Cation Trap				
Eluent 1:	Deionized water				
Eluent 2:	100 mM Methanesulfonic acid				
Gradient:	Time	E1	E2	E3	E4
	Initial	84	16	—	—
	5.00	84	16	—	—
	5.01	60	40	—	—
	10.00	60	40	—	—
	10.01	84	16	—	—
Flow Rate:	1.0 mL/min				
Inj. Volume:	25 μ L				
Detection:	Suppressed conductivity, CSRS™, AutoSuppression recycle mode				

The first inorganic anion to be eluted is fluoride, which is often added to municipal water supplies to prevent tooth decay and is harmless for brewing purposes. Chloride is eluted next, and at levels above 250 mg/L it has been found to enhance the sweetness of beer. However, it may also hamper yeast flocculation. Nitrate was once thought of as a problem in the brewing process, but it has since been discovered that it is the nitrite produced from nitrate that affects yeast metabolism to cause weak and incomplete fermentation. Sulfate is found naturally in water but imparts a sharp, dry edge to well hopped beers and is therefore kept to a minimum. Finally, phosphate is present in the malt and buffers the mash at a slightly acidic pH.

Inorganic Cations

As is the case with the inorganic anions, most of the inorganic cations are introduced into the beer from the water supply. The four most abundant cations in beer are sodium, potassium, calcium, and magnesium. Some of these cations affect the pH of the mash, while others affect the flavor of the beer. Other metals such as lead, copper, and zinc are also monitored to ensure their absence since most of them are poisonous at any significant level. This application note focuses on the alkali and alkaline earth metals.

Inorganic cations are separated by ion-exchange chromatography and monitored by suppressed conductivity detection, as described in Table 8. The gradient

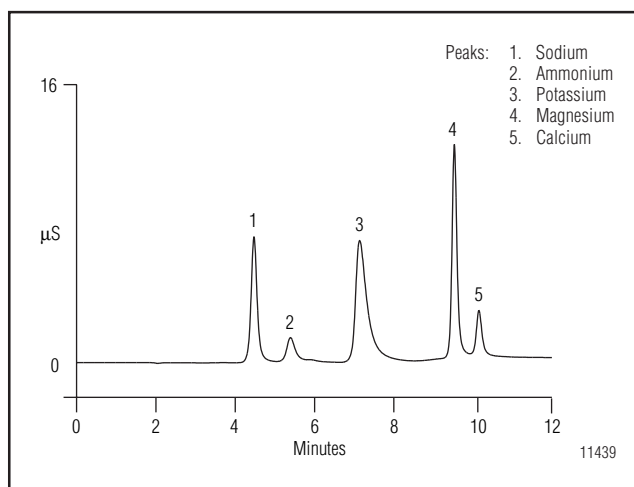


Figure 7 Separation of inorganic cations in a 1:40 dilution of an American lager by ion-exchange chromatography using the IonPac CS12 column. Experimental conditions are listed in Table 8.

allows for the separation of barium and strontium in addition to the five cations shown in Figure 7. A step change at 5 minutes from the weak eluent to a stronger eluent allows for the elution of sharp peaks for the divalent cations. The reproducibility of this method is on the order of 0.5% or better for retention times and 2% or better for peak areas. Linearity is good over the range tested (2 orders of magnitude) with a coefficient of determination, $r^2 = 0.999$ or better, for all analytes except ammonium. If it is not important to monitor for barium or strontium, the conditions can be changed to allow for isocratic elution of the five cations shown in Figure 7 (≤ 10 minutes). If isocratic elution is desired, then the concentration eluent should be 20 mM methanesulfonic acid.

Figure 7 shows the separation of the main cations in beer using the IonPac CS12 column. The sample was degassed and diluted 1:40 prior to injection. Sodium was the first peak to be eluted. At a concentration of 75–150 mg/L, it gives a round smoothness to the beer when combined with chloride. If too much sulfate is present, however, sodium gives an unpleasant harshness to the flavor. Potassium is the next metal to be eluted, and like sodium it can impart a slightly salty flavor to the beer. It also inhibits the action of certain enzymes in mash. Magnesium is an important nutrient for yeast at levels around 10–20 mg/L, but imparts a sharp, bitter-sour flavor at levels much higher than 20 mg/L. Calcium is perhaps the most important

metal, since it reacts with phosphate in the malt to lower the pH of the mash and wort. It also assists enzyme action, but has no effect on the flavor of the beer.

CONCLUSION

Carbohydrates, alcohols, organic acids, and inorganic anions and cations can all be separated on various ion-exchange or ion-exclusion columns and detected by pulsed amperometric or suppressed conductivity detection.

Although many of these constituents can be determined individually using unrelated analytical techniques, reduced analysis time and equipment costs can be realized by using one instrument with multi-species capability. Ion chromatography is a versatile technique that meets many of the analytical requirements of the beer making process.

LIST OF SUPPLIERS

EM Science, P.O. Box 70, 480 Democrat Road,
Gibbstown, New Jersey, 08027, USA,
1-800-222-0342.

Fisher Scientific, 711 Forbes Ave., Pittsburgh,
Pennsylvania, 15219-4785, USA, 1-800-766-7000.

Fluka Chemika-BioChemika, Fluka Chemie AG,
Industriestrasse 25, CH-9471 Buchs, Switzerland, +81
755 25 11.

Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis,
Missouri, 63178, USA, 1-800-325-3010.

AMMS, CSRS, ASRS, and CarboPac are trademarks and IonPac is a registered trademark of Dionex Corporation.



Printed on recycled and recyclable paper with soy-based ink.

Dionex Corporation
1228 Titan Way
P.O. Box 3603
Sunnyvale, CA
94088-3603
(408) 737-0700

Dionex Corporation
Salt Lake City Technical Center
1515 West 2200 South, Suite A
Sunnyvale, CA
Salt Lake City, UT
84119-1484
(801) 972-9292

Dionex U.S. Regional Offices
Sunnyvale, CA (408) 737-8522
Westmont, IL (630) 789-3660
Houston, TX (281) 847-5652
Smyrna, GA (770) 432-8100
Marlton, NJ (609) 596-0600

Dionex International Subsidiaries
Austria (431) 616 51 25 Belgium (015) 203800 Canada (905) 844-9650 France 01 39 46 08 40 Germany (06126) 991-0
Italy (6) 66030052 Japan (06) 885-1213 The Netherlands (076) 57 14 800 Switzerland (062) 205 99 66 United Kingdom (01276) 691722
* Designed, developed, and manufactured under an NSAI registered ISO 9001 Quality System.
<http://www.dionex.com>

