

离子色谱法测定酒中的有机酸和无机阴离子

潘丙珍¹, 刘青¹, 庞世琦¹, 张斯², 李志勇¹, 李荀¹, 陈文锐¹

(1. 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广东广州 510623)

(2. 广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510006)

摘要: 建立用离子色谱/电导检测法测定酒类中有机酸和无机阴离子的分析方法。样品经水稀释, 经0.45 μm滤膜过滤后直接进样检测; 选用Ionpac AS11阴离子交换分离柱, 氢氧化钾淋洗液梯度洗脱, 流速1.0 mL/min, 以抑制电导检测器检测。该方法对11种有机酸和5种无机阴离子具有良好的线性, 相关系数在0.9909~0.9997之间; 准确度和精密度良好, 样品加标回收率在81.0~117.8%之间, RSD小于5.0%; 检出限低, 在0.015~0.152 mg/L之间。该方法线性范围广, 准确性和精密度良好, 操作较简便, 结果满意, 能满足日常检验要求。

关键词: 离子色谱; 电导检测; 酒; 有机酸; 无机阴离子

文章编号: 1673-9078(2013)4-876-880

Determination of Organic Acids and Mineral Anions in Liquor by Ion Chromatography

PAN Bing-zhen¹, LIU Qing¹, PANG Shi-qi¹, ZHANG Si², LI Zhi-yong¹, LI Xun¹, CHEN Wen-rui¹

(1. Guangdong Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

(2. Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: A new method was established to determine organic acids and mineral anions in liquor by ion chromatography with conducting detection. The samples were diluted by water and filtrated with 0.45 μm membrane. The samples solution were injected and analyzed. Ionpac AS11 was selected as the separation column. The gradient KOH solution with a flow rate 1.0 mL/min was used as eluent. Auto-generated conducting detection ASRS-4mm was used. The method had good relativity (the correlative coefficients(r) were 0.9909~0.9997), and the extraction recoveries were 81.0~117.8%. In addition, the RSD were less than 5.0%, and the detection limits were 0.015~0.152 mg/L. The method had a wide linear range, good repeatability and accuracy.

Key words: ion chromatography; conductivity detection; liquor; organic acids; mineral anions

有机酸是酒中的重要物质, 酒中有机酸的种类及其浓度决定着酒的类型、品质和保质期。它们影响着酒的口感、色泽及生物稳定性^[1-3]。酒中的有机酸主要有乳酸、乙酸、苹果酸、柠檬酸、酒石酸、富马酸、苯甲酸、柠檬酸、丙酮酸、甲酸、丙酸等^[4]。葡萄酒的酸度由有机酸决定, 其中酒石酸、苹果酸和柠檬酸来自葡萄果实, 乳酸、乙酸等来自葡萄酒的发酵过程, 酒石酸只存在于葡萄属植物和天竺属植物中, 因此又名“葡萄酒酸”, 是葡萄和葡萄酒中的特征酸。有机

收稿日期: 2012-12-02

基金项目: 广东省科技计划项目 (2011B050400025), 质检公益性行业科研专项 (201210104-2), 广东省科技计划项目 (2010B020316006)

作者简介: 潘丙珍 (1975-), 女, 硕士, 主管技师, 研究方向为食品安全与检测

通讯作者: 刘青 (1971-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向为食品安全与检测; 李志勇 (1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为食品安全与检测

酸含量对葡萄酒是否变质起着决定性的作用^[5-7]。有机酸含量也是国际葡萄与葡萄酒组织规定的能反映真葡萄酿造产品的重要指标之一。因此进行葡萄酒有机酸的检测有助于对葡萄酒分辨真假和区别优劣。有机酸在黄酒中既是香气, 又是呈味物质, 能起到除苦、减涩、压暴、矫正和缓和口味, 稳定香气, 柔和酒体, 协调滋味, 延长回味, 丰富酒质香味和提高酒的品质^[6]。有机酸类物质也是表征啤酒质量的重要指标, 是啤酒的重要风味物质, 测定啤酒中各种有机酸含量还有助于改进生产工艺, 通过控制有机酸代谢来达到控制啤酒质量的目的。因此, 测定酒中有机酸具有非常重要的意义。

目前有机酸的检测方法有分光光度法^[7-8]、毛细管电泳法^[9]、高效液相色谱法^[10-11]、离子色谱法^[12-15]等。分光光度法要进行繁琐的样品前处理, 能同时分析的有机酸种类较少; 高效液相色谱法和毛细管电泳法灵

灵敏度较低；有机酸也可用酶法分析，但酶法分析不能同时分析多种有机酸，一次只能分析一种。而离子色谱-抑制电导法测定酒类中有机酸和阴离子，样品前处理简单，检测方法灵敏度高，重现性好，能同时分析的物质种类多。国内有报道采用三级梯度淋洗成功地分离了酒中16种有机酸和无机阴离子^[2]，方法简便快速高效，但对仪器配置要求高。本实验采用二级梯度淋洗成功地分离了酒中11种有机酸和5种阴离子，并对国内外葡萄酒、黄酒、啤酒等实际样品进行了检测分析。

1 试验部分

1.1 仪器

ICS-1500 离子色谱仪 (Dionex)：包括 LC30 色谱炉，ED50A 电导检测器，GP50 梯度泵，EG50 自动淋洗液发生器，AS40 自动进样器；ASRS 300-4mm 抑制器；Chromleon 色谱工作站；超纯水机。

1.2 试剂

标准物质：乳酸、丙酮酸、苹果酸、酒石酸、富马酸、柠檬酸、马来酸，购自 sigma 公司；苯甲酸购自 Dr.Ehrenstorfer GmbH；丙酸购自 damas-beta 公司；乙酸、甲酸（分析纯）购自广州化学试剂厂，Cl⁻、NO₂⁻、NO₃⁻、SO₄²⁻、PO₄³⁻，购自中国标准物质中心；超纯水：电阻 18.2 MQ；水相尼龙滤膜：0.45 μm。

1.3 色谱条件

分析柱：IonPac AS11 (4×250 mm)，保护柱：IonPac AG11 (4×50 mm)，淋洗液：0.2~25 mmol/L KOH（见表1），淋洗液流速：1.0 mL/min，进样体积：25 μL，色谱池温度：35 ℃，柱温：30 ℃，抑制器电流：100 mA，以保留时间定性，峰面积定量。

表1 梯度淋洗条件

Table 1 Gradient condition for separation

时间/min	KOH 浓度/(mmol/L)
0	0.2
12	0.2
50	25
55	25
60	0.2

1.4 测定方法

1.4.1 样品处理

葡萄酒样品测定前用去离子水稀释100倍，黄酒与啤酒样品测定前用去离子水稀释20倍，再经0.45 μm水相尼龙滤膜过滤，收集滤液待测。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

实验选择氢氧根系阴离子交换色谱柱-IonPac AS11柱，IonPac AS11柱适用于快速检测食品、饮料、化学药品、废水等样品中的无机阴离子和有机酸阴离子，AS11柱的重要应用是以氢氧化钾为淋洗液，梯度洗脱，抑制型电导检测。适合用于检测酒类中无机阴离子和有机酸。

酒类基质较复杂，所含离子众多，要准确检测的无机阴离子和有机酸多达16种，必须将目标离子与共存离子有效分离。分离柱选定后，淋洗液对分离效果起决定性作用。淋洗液浓度小，离子出峰时间延长，各离子分离度大，分离效果好；淋洗液浓度大，离子出峰时间减短，各离子分离度变小，分析时间短；各有所长。采用较高浓度淋洗液等度淋洗时，13种离子不能很好地分离；而低浓度等度淋洗又会造成分析时间过长，强保留组分无法洗脱的现象。为了使各种离子实现较好地分离，而又节省分析时间。实验采用梯度淋洗方法进行洗脱分离。因乳酸和乙酸很难有效分离，第一淋洗液梯度先后采用0.8、0.5、0.2、0.1 mmol/L进行试验，在浓度为0.8、0.5 mmol/L时，乳酸和乙酸几乎无法分离，降至0.2 mmol/L浓度时，乳酸和乙酸能较好分离，再降至0.1 mmol/L，分离度无明显改变，故选择0.2 mmol/L；第二淋洗液梯度先后采用35、30、25、20 mmol/L进行试验，在浓度为35、30 mmol/L时，苹果酸、酒石酸、硫酸根、富马酸四种物质不能很好地分离，而25 mmol/L时四种物质能较好地分离，当降至20 mmol/L时分离度无明显改变，故选择25 mmol/L。

淋洗液的流速同样会影响到离子的出峰时间、分离度和灵敏度。随着淋洗液流速的增大，出峰时间会提前，分离度也会变小，峰面积也会随之减小，导致灵敏度下降，系统的压力增大。总流速较小时，分离效果较好，但保留时间延长。较低流速有利于提高检测灵敏度，尤其在阴离子总浓度较大时。本试验先后采用1.0、0.8、0.6 mL/min进行试验，发现各离子分离度无明显变化，为缩短分析时间，选择1.0 mL/min。

2.2 线性范围、检测限和精密度

分别配制不同浓度的9种有机酸和4种阴离子的混合标准溶液，在上述规定的试验条件下进样检测，取其中一个混合标准溶液重复测定6次，以峰面积与质量浓度进行一元线性回归分析，计算保留时间和峰面积的相对标准偏差，进行线性关系、线性范围、检测限和精密度的测定。11种有机酸和5种阴离子在较宽的浓度范围内均具有良好的线性，相关系数都大于0.99，检测限较低，精密度较好（见表2），标准色谱图见图1。以3倍信噪比计算最小检测限。

表2 11种有机酸和5种无机阴离子工作曲线、线性、检测限和精密度

Table 2 The working curve ,linearities, detection limits and RSD% of standard samples (n=6)

标准物质	工作曲线	相关系数	线性范围/(mg/L)	检测限/(mg/L)	保留时间RSD/%	峰面积RSD/%
乳酸	y=0.1214x-0.0648	0.9995	0.2~70	0.051	0.366	4.35
乙酸	y=0.1285x+0.0436	0.9909	0.1~10	0.023	0.475	4.39
丙酸	y=0.1226x-0.0562	0.9995	0.2~70	0.068	0.086	3.23
甲酸	y=0.1237x-0.0398	0.9995	0.2~70	0.059	0.073	2.99
丙酮酸	y=0.1033x-0.0017	0.9994	0.5~40	0.082	0.051	3.47
Cl ⁻	y=0.342x+0.123	0.9992	0.1~40	0.024	0.089	1.35
NO ₂ ⁻	y=0.173x-0.016	0.9993	0.1~40	0.035	0.096	3.01
NO ₃ ⁻	y=0.188x-0.013	0.9996	0.1~40	0.029	0.083	2.40
苯甲酸	y=0.080x+0.006	0.9996	0.5~50	0.031	0.027	2.87
苹果酸	y=0.075x+0.079	0.9996	1~70	0.026	0.12	4.54
酒石酸	y=0.116x+1.218	0.9978	1~70	0.030	0.062	4.14
马来酸	y=0.134x+1.087	0.9980	1~70	0.034	0.079	4.08
SO ₄ ²⁻	y=0.234x+0.465	0.9995	0.1~40	0.036	0.034	4.48
富马酸	y=0.148x+0.305	0.9972	0.2~40	0.015	0.027	4.26
PO ₄ ³⁻	y=0.098x-0.015	0.9996	0.5~40	0.152	0.040	0.74
柠檬酸	y=0.082x+0.013	0.9997	0.2~60	0.063	0.426	4.32

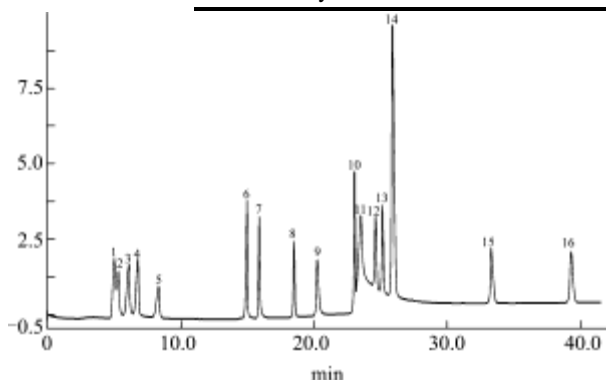
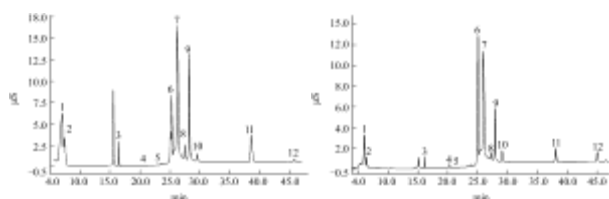


图1 11种有机酸和5种无机阴离子标准色谱图

Fig.1 Ion chromatogram of nine organic acids and four mineral anions

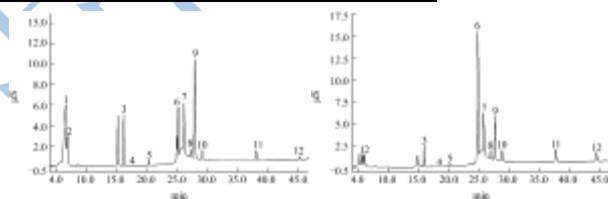
注: 1.乳酸 (5 mg/L), 2.乙酸 (2 mg/L), 3.丙酸 (5 mg/L), 4.甲酸 (5 mg/L), 5.丙酮酸 (5 mg/L), 6.Cl⁻ (2 mg/L), 7.NO₂⁻ (5 mg/L), 8.NO₃⁻ (5 mg/L), 9.苯甲酸 (5 mg/L), 10.苹果酸 (5 mg/L), 11.酒石酸 (5 mg/L), 12.马来酸, 13.SO₄²⁻ (2 mg/L), 14.富马酸, 15.PO₄³⁻ (5 mg/L), 16.柠檬酸 (5 mg/L)。

2.3 样品的稀释处理



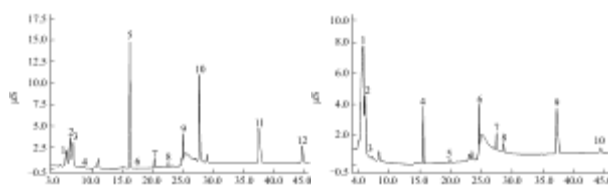
a.法国红葡萄酒色谱图

b.法国白葡萄酒色谱图



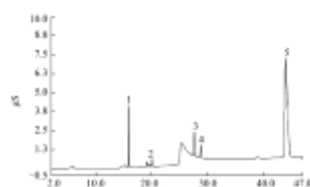
c.国产红葡萄酒色谱图

d.国产白葡萄酒色谱图



e.国产啤酒色谱图

f.国产黄酒色谱图



g. 国产葡萄露酒色谱图

图2 样品测定色谱图

Fig.2 Ion chromatogram of real sample

注: a~d: 1.乳酸, 2.乙酸, 3.Cl⁻, 4.NO₃⁻, 5.苯甲酸, 6.苹果酸, 7.酒石酸, 8.马来酸, 9.SO₄²⁻, 10.富马酸, 11.PO₄³⁻, 12.柠檬酸; e: 1.乳酸, 2.乙酸, 3.甲酸, 4.丙酮酸, 5.Cl⁻, 6.NO₃⁻, 7.苯甲酸, 8.苹果酸, 9.SO₄²⁻, 10.富马酸, 11.PO₄³⁻, 12.柠檬酸; f: 1.乳酸, 2.乙酸, 3.甲酸, 4.Cl⁻, 5.NO₃⁻, 6.苹果酸, 7.SO₄²⁻,

8.富马酸, 9.PO₄³⁻, 10.柠檬酸; g: 1.Cl⁻, 2.NO₃⁻, 3.SO₄²⁻, 4.富马酸, 5.柠檬酸。

不同的酒类中各种离子含量相差较大, 稀释度对各种离子的检出和分离影响很大。试验对不同的样品进行了不同稀释度处理进行分析。对葡萄酒样品, 分别进行了稀释100倍和50倍进样分析, 发现稀释50倍时部分有机酸含量过高而不能有效分离; 对黄酒和啤酒, 分别进行了稀释50倍和20倍进样分析, 稀释50倍时部分有机酸含量过低而检测不到, 稀释20倍比较合适。

在选定实验条件下, 多种酒样有机酸和阴离子能得到较好的分离, 见样品图谱(图2)。

2.4 准确度试验

向已知11种有机酸和5种阴离子浓度的红葡萄酒、白葡萄酒、啤酒和黄酒稀释后样品中添加不同浓度的有机酸和阴离子混合标准溶液标准, 按1.4.1方法进行处理, 进样分析, 每个进行6次平行测定, 计算其回收率。结果表明, 平均回收率在81.0~117.8%之间, 见表3和表4。

表3 葡萄酒样品加标回收结果

Table 3 The recovery results of organic acids and mineral anions in grape wine

有机酸	红葡萄酒				白葡萄酒			
	本底 /(mg/L)	加标量 /(mg/L)	检测值 /(mg/L)	回收 率/%	本底 /(mg/L)	加标量 /(mg/L)	检测值 /(mg/L)	回收 率/%
乳酸	16.99	10.00	26.35	93.6	2.56	1.00	3.49	93.0
乙酸	5.83	1.00	6.80	97.0	3.28	1.00	4.19	91.0
丙酸	-	0.50	0.47	94.0	-	0.50	0.47	94.0
甲酸	-	0.50	0.46	92.0	-	0.50	0.47	94.0
丙酮酸	-	0.50	0.46	92.0	-	0.50	0.47	94.0
Cl ⁻	0.85	0.50	1.36	102.0	0.60	0.50	1.09	98.3
NO ₂ ⁻	-	0.50	0.48	96.0	-	0.50	0.48	96.0
NO ₃ ⁻	0.39	0.50	0.89	100.0	0.39	0.50	0.91	104.0
苯甲酸	0.32	0.50	0.78	92.0	0.25	0.50	0.68	86.0
苹果酸	9.95	5.00	14.57	92.4	27.02	5.00	31.61	91.8
酒石酸	10.43	10.0	21.03	106.0	18.55	5.00	22.67	82.4
马来酸	2.85	2.00	4.77	96.0	1.59	2.00	3.51	96.0
SO ₄ ²⁻	3.44	1.00	4.54	110.0	4.89	0.50	5.38	98.0
富马酸	2.91	1.00	3.85	94.0	5.92	1.00	6.79	87.0
PO ₄ ³⁻	4.28	2.00	6.28	100.0	2.98	2.00	4.76	89.0
柠檬酸	0.69	0.50	1.28	118.0	2.00	1.00	3.12	112.0

表4 黄酒和啤酒样品加标回收结果 (n=6)

Table 4 The recovery results of organic acids and mineral anions in rice wine and beer

有机酸	黄酒				啤酒			
	本底 /(mg/L)	加标量 /(mg/L)	检测值 /(mg/L)	回收 率/%	本底 /(mg/L)	加标量 /(mg/L)	检测值 /(mg/L)	回收 率/%
乳酸	31.09	10.00	40.35	92.6	3.66	1.00	4.81	115.0
乙酸	8.79	4.00	12.32	88.3	4.08	1.00	5.18	110.0
丙酸	-	0.50	0.46	92.0	-	0.50	0.46	92.0
甲酸	0.56	0.50	1.00	88.0	1.70	1.00	2.65	95.0
丙酮酸	-	2.00	1.86	93.0	0.64	1.00	1.58	94.0
Cl ⁻	1.36	0.50	1.82	92.0	7.28	1.00	8.16	88.0
NO ₂ ⁻	-	0.50	0.48	96.0	-	0.50	0.47	94.0
NO ₃ ⁻	0.52	0.50	0.99	94.0	0.82	1.00	1.83	101.0
苯甲酸	-	0.50	0.41	82.0	0.24	1.00	1.19	95.0

转下页

接上页

苹果酸	5.61	2.00	7.61	100.0	4.00	2.00	5.71	85.5
酒石酸	-	1.00	0.91	91.0	-	2.00	1.87	93.5
马来酸	-	1.00	0.90	90.0	-	1.00	0.91	91.0
SO ₄ ²⁻	0.54	0.50	1.02	96.0	1.41	1.00	2.39	98.0
富马酸	3.69	2.00	5.55	93.0	0.15	1.00	1.00	85.0
PO ₄ ³⁻	6.67	2.00	8.83	108.0	9.85	2.00	11.89	102.0
柠檬酸	1.14	1.00	2.21	107.0	4.36	2.00	6.29	96.5

2.5 几种酒样品有机酸含量比较

在方法所规定的条件下,对多个酒样进行检测,结果见表5。葡萄酒中丙酸、甲酸和丙酮酸无检出,黄酒中丙酸、丙酮酸、苯甲酸、酒石酸无检出,啤酒中无酒石酸和丙酸检出,而葡萄露酒样中柠檬酸很高,其他酸均无检出。红葡萄酒与白葡萄酒因生产工艺不同,其各种有机酸含量有差异。葡萄酒、黄酒、啤酒酿酒原料不同,所含有机酸种类与含量也不相同。而所检测的葡萄露酒样品则仅富含马酸和柠檬酸。

表5 几种酒样品有机酸和无机阴离子含量比较(单位:mg/L)

Table 5 Contents of organic acids and mineral anions in liquors

有机酸	进口红葡	进口白葡	国产红葡	国产白葡	国产黄酒	国产啤酒	国产葡萄露酒
乳酸	1128.40	279.27	2328.90	176.67	621.74	73.28	-
乙酸	430.84	211.89	260.34	174.90	175.82	81.56	-
丙酸	-	-	-	-	-	-	-
甲酸	-	-	-	-	11.28	34.08	-
丙酮酸	-	-	-	-	-	12.70	-
Cl ⁻	76.63	54.00	101.83	59.16	27.16	145.62	169.58
NO ₂ ⁻	-	-	-	-	-	-	-
NO ₃ ⁻	91.34	80.69	15.80	16.28	10.36	16.46	67.50
苯甲酸	31.75	24.75	11.03	10.38	-	4.72	-
苹果酸	853.23	1961.60	718.90	4213.43	112.10	80.06	-
酒石酸	1826.90	1049.50	957.50	646.37	-	-	-
马来酸	285.40	158.70	223.40	215.60	-	-	-
SO ₄ ²⁻	640.31	295.45	312.20	182.59	10.80	28.12	145.00
富马酸	332.36	474.14	26.50	42.66	73.80	3.02	63.22
PO ₄ ³⁻	800.43	263.94	345.30	375.67	133.38	196.92	-
柠檬酸	26.33	217.20	7.41	270.10	22.88	87.19	4262.0

3 结论

3.1 本研究建立以IonPac AS11(4×250 mm)色谱柱分离,0.2~25 mmol/L KOH溶液作为淋洗液,流速为1.0 mL/min,进样体积为25 μL,离子色谱-电导检测测定酒类中的有机酸和无机阴离子的方法,该方法简便快捷,精密度和准确度较好,适用于酒类有机酸和无

机阴离子的检测。

3.2 本研究对葡萄酒、黄酒、啤酒等实际样品进行了有机酸和无机阴离子含量的检测,发现由于葡萄酒、黄酒、啤酒酿酒原料不同,生产工艺不同,所含有机酸种类与含量也不尽相同。测定酒类有机酸含量有助于对葡萄酒分辨真假和区别优劣;也有助于改进生产工艺,通过控制有机酸代谢来达到控制啤酒、黄酒质量的目的。

参考文献

- [1] Inés Mato, Silvia Suarez-Luque, José F Huidobro. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection [J]. Food Chemistry, 2007, 102: 104-112
- [2] U Regmi, M Palma, C G Barroso. Direct determination of organic acids in wine and wine-derived products by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometric techniques [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 723: 137-144
- [3] Stella Rovio, Kimmo Sirén, Heli Sirén. Application of capillary electrophoresis to determine metal cations, anions, organic acids, and carbohydrates in some Pinot Noir red wines [J]. Food Chemistry, 2011, 124: 1194-1200
- [4] 谢文逸. 酒类酸度及有机酸分析进展 [J]. 酿酒科技, 2002, 2: 81-82
- [5] 问亚琴, 张艳芳, 潘秋红. 葡萄果实有机酸的研究进展 [J]. 海南大学学报自然科学版, 2009, 27(3): 302-307
- [6] 汪建国. 浅谈黄酒中有机酸的特征和功能 [J]. 中国酿造, 2008, 14: 81-83
- [7] Castineira A, Pena R M, Herrero C. Analysis of organic acids in wine by capillary electrophoresis with direct UV detection [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2002, 15(3), 319-331
- [8] 陈峰. 二阶导数红外分光光度法同时定量分析有机酸、酯 [J]. 分析实验室, 1994, 13(3): 41-43
- [9] 唐美华, 屠春燕, 薛亚芳, 等. 毛细管电泳法测定葡萄酒中的有机酸含量 [J]. 食品科学, 2009, 30(8): 209-211
- [10] 林耀盛, 杨春英, 陈智毅, 等. 青梅酱中的有机酸成分分析 [J].

- 现代食品科技,2011,27(9):1150-1153
- [11] 黄桂颖,白卫东,杨幼慧,等.反相高效液相色谱法测定荔枝肉中 10 种有机酸[J].现代食品科技,2009,25(5):568-570
- [12] 吴飞燕,贾之慎,朱岩.离子色谱电导检测法测定酒中的有机酸和无机阴离子[J].浙江大学学报(理学版),2006, 33(3):312-315
- [13] 成霏,刘佳,顾慧莹,等.离子色谱法测定果酒中的有机酸[J].分析与检测,2011,37(8):175-177
- [14] Carlos Mongay, Agustin Pastor, Carmen Olmos. Determination of carboxylic acids and inorganic anions in wines by ion-exchange chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 1996, 736: 351-357
- [15] Ines Mato, Silvia Suarez-Luque, Jose FHuidobro. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines [J]. Food Research International, 2005,38: 1175-118

现代食品科技