

# 顶空-毛细管气相色谱法测定葡萄酒中的甲醇

曾游, 丁怡

(广州市酒类检测中心, 广东广州 510160)

**摘要:** 本文对炉温、保温时间、气液相比和盐析试验 4 个方面对测定葡萄酒中甲醇的顶空—毛细管气相色谱法进行摸索, 确定最优的顶空气相色谱分析条件为: 以 ZB-WAX 毛细柱为分析用色谱柱, 分流进样(分流比 20:1、2 mm 分流衬管); 载气流速 2.0 mL/min; 炉温 70 °C; 保温时间 15 min; 测定液 5 mL; 不加盐析剂, FID 为检测器。方法在甲醇浓度范围 10.2~407.6 mg/L 之间线性良好,  $r=0.9997$ ; 平均回收率 99.2%, 样品重现性 RSD 为 1.4%, 检出限为 8.5 mg/L, 本方法与国标 GB/T 15038-2006 方法相比简便、高效, 测定结果可靠。

**关键词:** 顶空; 气相色谱; 葡萄酒; 甲醇

文章篇号: 1673-9078(2013)2-405-408

## Determination of Methanol in Wine by Head Space GC with Capillary Column

ZENG You, DING Yi

(Guangzhou Wine Analytical Centre, Guangzhou 510160, China)

**Abstract:** In this paper, through four factors such as temperature, time, the ratio of gas-liquid phase and salting out, the determination of methanol in wine by head space GC with capillary column was studied and the optimal conditions were found as following: using a Phenomenex ZB-WAX chromatographic column and a FID detector. The split ratio was 20 with split liner tube (2mm I.D) and the flow rate of carrier gas was 2.0 mL/min. The heated temperature was 70°C with head space sampling used and vial equilibration time was 15 min and sample volume was 5 mL in a 20mL vial. The linear of this method was satisfied when the concentration of methanol was at the range of 10.2~407.6 mg/L ( $r=0.9997$ ). The lowest method detection limit was 8.5 mg/L and the average recovery rate was 99.2%. RSD of Repeat was 1.4%. It was shown that this method is more simple and efficient than GC method in GB/T 15038-2006, and the result was reliable.

**Keywords:** head space; gas chromatography; wine; methanol

葡萄酒的主要原料葡萄的果胶质含量较高, 在发酵之后甲醇含量会增高。葡萄酒中甲醇含量过高对人体中枢神经有抑制作用, 尤其对视网膜神经系统毒性更大<sup>[1]</sup>, 因此, 对葡萄酒中甲醇的测定保证其质量意义重大。

葡萄酒中含有大量糖类、氨基酸、色素、维生素等多种难挥发组分<sup>[1]</sup>, 这些成分因极性大而在气相色谱柱中死吸附, 造成色谱柱的污染和柱效降低, 使检测结果的精密度和准确性都受到影响, 并造成色谱柱的使用寿命降低等结果。国标 GB/T 15038-2006<sup>[2]</sup>气相色谱法测定其甲醇含量时须先将样品通过蒸馏法对其进行预处理, 去除样品中不挥发性物质以保护色谱柱, 但这样前处理时间、分析时间均较长。由于此法引入内标, 其分析结果结果重现性差。

顶空气相色谱法的报道最早见于 1958 年, 该分析技术近年发展很快<sup>[3~4]</sup>, 国外报道<sup>[5]</sup>对这种技术从实践和理论作了详细论述。顶空气相色谱已在农业、食品科学、环境分析和医学分析等领域有应用<sup>[6]</sup>。顶空气相色谱法测定葡萄酒中甲醇具有样品处理简单, 操作方便, 干扰少和分析时间缩短的优点。叶建晨<sup>[7]</sup>选用异丙醇作为内标, 建立静态顶空气相色谱法测定葡萄酒中甲醇, 但该法加入异丙醇作内标, 增加前处理时间和引入内标加入量的误差, 前处理也较为复杂。

针对葡萄酒中甲醇含量较低, 本文采用顶空气相色谱法, 外标标准曲线法定量, 通过对气相色谱顶空进样多种条件进行筛选, 从炉温、保温时间、气液相比和盐析试验 4 个方面进行考察, 采用 WAX 毛细柱和 FID 检测器, 建立葡萄酒中甲醇测定的顶空-毛细管气相色谱法。

### 1 材料与方法

收稿日期: 2012-08-29

项目基金: 广州市科技项目基础研究专项 (11C15380690)

作者简介: 曾游, 女, 助理工程师, 从事酒类质量检测及食品安全检测。

### 1.1 试剂

无水乙醇, 色谱纯, 99.8%, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 甲醇标样, 色谱纯, 99.5%, 天津市光复精细化工研究所; 干红葡萄酒, 市售; 试验用水为二级水。

### 1.2 溶液配制

10% (体积分数) 乙醇溶液: 量取 50 mL 无水乙醇于 500 mL 容量瓶内, 再用纯水定容至刻度; 甲醇储备液: 精确吸取 2 mL 甲醇标样于 100 mL 容量瓶内, 再用 10% 乙醇溶液定容至刻度, 浓度为 15920.0 mg/L, 冷藏; 甲醇一级工作液: 精密吸取 4 mL 甲醇储备液于 50 mL 容量瓶中, 用 10% 乙醇溶液定容至刻度, 浓度为 1273.6 mg/L, 新鲜配制; 甲醇二级工作液: 精密吸取 4 mL 甲醇一级工作液于 50 mL 容量瓶中, 用 10% 乙醇溶液定容至刻度, 浓度为 101.9 mg/L, 新鲜配制。

### 1.3 仪器设备

Clarus600 气相色谱仪, PSS 进样口, 2 mm 衬管和 FID 检测器, 美国 PerkinElmer 公司; TotalChrom 色谱工作站, 美国 PerkinElmer 公司; TurboMatrix 40 自动顶空进样器 (40 位进样瓶和 12 位保温槽), 美国 PerkinElmer 公司; ZB-WAX 毛细柱 30 m×0.25 mm×0.25 μm, 美国 Phenomenex 公司; 22 mL 顶空进样瓶 (带聚四氟乙烯 (PTFE) 密封硅胶垫); Elix 纯水机, 美国 Millipore 公司; 高纯氮气、高纯氢气、干燥空气。

### 1.4 气相和顶空色谱条件

#### 1.4.1 气相色谱条件

载气: 高纯氮气; 载气流速: 2.0 mL/min; 进样口温度: 200 °C; 柱温程序: 45 °C 保持 3.5 min, 35 °C/min 升温至 150 °C, 保持 3.5 min, 40 °C/min 降温至 45 °C, 保持 1.5 min; 检测器温度: 250 °C; 空气流速: 400 mL/min; 氢气流速: 40 mL/min。

#### 1.4.2 顶空进样条件

进样时间: 0.02 min (仪器可设定范围 0.00~9.9 min); 加压时间: 3 min; 拔针时间: 0.5 min; 传输线温度: 200 °C; 针温度: 80 °C; 柱压: 30 psi, 高压模式; 进样压: 30 psi。

### 1.5 试验方案

从炉温、保温时间、气液相比和盐析试验 4 个方面进行考察, 由线性、检出限、重现性、加标回收和不同进样方式结果比对的试验结果评价此方法的精密度和准确度, 确定最适宜分析葡萄酒中甲醇的顶空气相色谱方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 工作曲线的绘制

取甲醇一级工作液适量, 用 10% 乙醇溶液稀释成 8 个浓度的标准溶液, 浓度分别为 10.2、35.7、50.9、76.4、101.9、152.8、203.8、407.6 mg/L。分别吸取 5.0 mL 至顶空瓶, 压盖 (以上操作要求在 2 min 内完成), 按方法测定条件分析, 将峰面积对组分浓度作曲线, 线性回归方程为  $Y=106.3x+240.0$ ,  $r=0.9997$ , 可见此方法条件下进行试验, 具有良好的线性。

### 2.2 顶空条件的优化

#### 2.2.1 炉温试验

从甲醇二级工作液中分别取 5.0 mL 至 5 个顶空瓶中, 轧封进样, 炉温分别为 40、50、60、70、80 °C, 以峰面积作为目标值, 比较不同炉温对葡萄酒中甲醇分析的影响。结果见表 1。

表 1 不同炉温甲醇分析结果 (恒温时间为 30min)

Table 1 Chromatograms of methanol analyzed by heated temperature (vial equilibration time was 30min)

炉温/°C	40	50	60	70	80
甲醇溶液					
浓度/(mg/L)	101.9				
峰面积	18504	24519	45376	66475	97285

亨利定律表明, 在密闭容器内, 升高温度有利于提高液体中溶质向顶部气体内的逸散量<sup>[8]</sup>。本实验结果甲醇峰面积与炉温呈正比, 充分验证了上述原理。但是葡萄酒中水含量很大, 温度过高会产生较多水汽进入色谱柱, 极性很强的水分子对大部分毛细管柱固定相有较强的破坏性, 造成柱流失, 柱效降低, 因此, 结合理论和实际甲醇的响应值, 选用 70 °C 炉温为最佳平衡温度。

#### 2.2.2 保温时间

从甲醇二级工作液分别取 5.0 mL 至 5 个顶空瓶中, 压盖进样, 保温时间取 5 个水平, 分别是 15、20、25、30、35 min, 分析结果见表 3。

表 2 不同保温时间甲醇分析结果

Table 2 Chromatograms of methanol analyzed by equilibration

	time				
保温时间/min	15	20	25	30	35
甲醇溶液					
浓度/(mg/L)	101.9				
峰面积	20456	20499	21718	21064	21106

保温时间是达到气液平衡的必要条件, 它是影响测定结果的重要因素, 本实验 5 个同样浓度甲醇溶液在不同保温时间后进行分析, 甲醇峰面积变化不明显, 综合考虑时间、重复性等方面因素, 选择保温时间 15 min。

#### 2.2.3 气液相比对顶空进样的影响

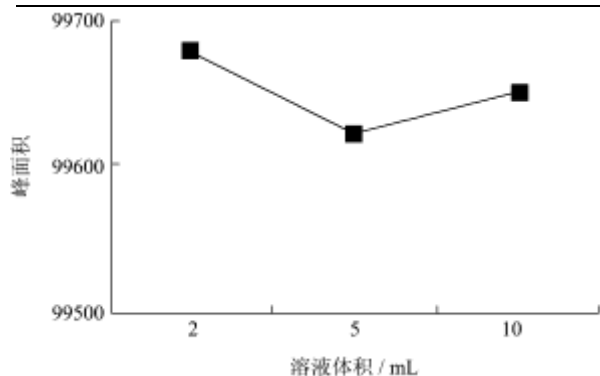


图1 气-液相比对顶空浓度的影响

Fig.1 The effects of ratio of gas-liquid phase on the concentration of head space

分别取 2、5、10 mL 同一甲醇溶液至顶空瓶中，在相同顶空和色谱条件下进行试验，从图 1 看出，改变气液相比对亨利常数小的甲醇顶空浓度影响很小。为减少误差和检测样品量，本方法选择 5 mL 液体体积作为最佳分析体积。

2.2.4 盐析试验

添加盐析剂可以增加活度系数，降低物质的溶解度，提高液面上被测挥发组分的浓度<sup>[9-10]</sup>。本文在顶空瓶中分别加入 2 g NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>4</sub> 和 5 mL 甲醇二级工作液，在同一顶空条件下进样。结果甲醇峰面积增大，但从图 2 分析图谱可看出加入盐析剂后，峰面积有所增大，但峰形差，干扰多，基线不稳，重现性差。考虑不加盐析剂顶空浓度可满足分析要求且样品处理更为简便，本方法选择不添加盐析剂。结果对比见图 2。

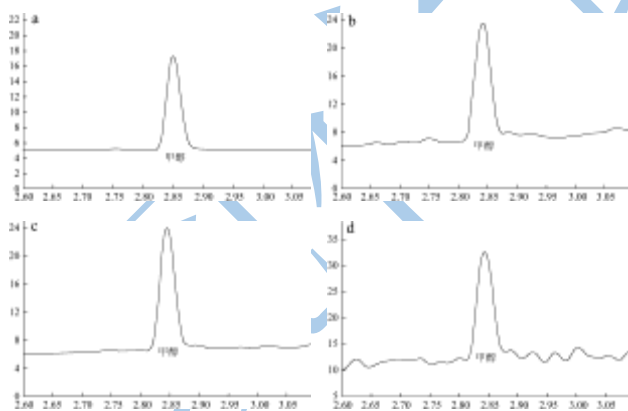


图2 添加盐析剂对甲醇测定的影响

Fig.2 Chromatograms of methanol analyzed by adding salt

注：a：不加盐析剂的甲醇分析图谱；b：NaCl 作盐析剂的甲醇分析图谱；c：Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作盐析剂的甲醇分析图谱；d：(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作盐析剂的甲醇分析图谱。

2.2.5 时间程序优化

本文使用的设备有 12 个保温炉，经优化后（计算机软件设置可设定时间程序，对多样品同时加热）从

前处理开始，每 12 min 即可完成一个样本的测试，GB/T15038-2006<sup>[2]</sup>需 60 min 完成一个样本测试。

2.3 方法评价

2.3.1 方法检出限

国标 GB/T5009.1-2003<sup>[11]</sup>色谱法的检出限测定要求，检出限=最低响应值/b=S/b, S 为仪器噪音的 3 倍，b 为标准曲线回归方程中的斜率。

配制一个低浓度的甲醇溶液（2.038 mg/L），进样得到最低响应值 S=906，标准曲线回归方程斜率为 106.3，计算仪器最低检出限为 8.5 mg/L，定量限为 25.5 mg/L；GB/T15038-2006<sup>[12]</sup>气相色谱法（内标法）最低检出限 4.0 mg/L。国标 GB10537-2006<sup>[13]</sup>要求白、桃红葡萄酒甲醇限值小于等于 250 mg/L，红葡萄酒甲醇限值小于等于 400 mg/L，国标要求属于限量要求，因此所建立的顶空气相色谱法检出限可以满足检测要求。

2.3.2 精密度试验

分别取甲醇二级工作液和葡萄酒样品 5 mL 至不同顶空瓶中，各制 6 个平行，以峰面积进行精密度分析，结果见表 3。

表3 精密度试验结果

Table 3 precision of methanol analyzed

	甲醇标样	葡萄酒样
1	11174	14613
2	10900	14357
3	10787	14828
4	10689	14808
5	11014	14498
6	10969	14834
平均值	10922	14656
RSD%	1.6	1.4

从上述分析结果看，顶空气相色谱法分析甲醇溶液和葡萄酒样品结果精密度良好，满足分析要求。

2.3.3 准确度试验

表4 葡萄酒中甲醇加标回收率

Table 5 recovery of methanol in wine

样品含量/mg	加标量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.156	0.153	0.303	98.1		
0.156	0.153	0.304	98.4		
0.156	0.153	0.304	98.4		
0.312	1.274	1.602	101.0		
0.312	1.274	1.609	101.5	99.2	1.6
0.312	1.274	1.599	100.8		
0.624	2.547	3.103	97.9		
0.624	2.547	3.073	96.9		
0.624	2.547	3.171	100.0		

将不同量的甲醇一级工作液或二级工作液加至已测得甲醇含量为 156.0 mg/L 的葡萄酒样品(市售的成品葡萄酒中均含有一定量甲醇,无法获得无甲醇样品)中,分别制备 30.9、158.6、317.1 mg/L 三个浓度的回收率试样,各 10mL,每个浓度配 3 个平行样,依法测定,测得回收率在 96.9%~101.5%之间,平均回收率为 99.2%, RSD 为 1.6% (n=9)。结果见表 4。

### 2.3.4 顶空气相色谱法与国标方法测定结果的比较

选 6 个不同市售葡萄酒样品,用顶空气相色谱法和国标方法两种方法分别测其甲醇含量,用 F 检验和 t 检验分析统计两种不同方法测定结果是否有差异,见表 5,统计量 F=0.37 小于显著水平  $\alpha = 0.05$  的 F 临界值 4.96,两种测定方法结果方差无显著性差异;统计量 t=0.61 小于显著水平  $\alpha = 0.05$  的 t 双尾临界值为 2.23,即两种不同分析方法结果无差异。样品图见图 3。

表 5 两种分析方法结果比较 (F 检验和 t 检验)

Table 5 Compared to the result of two methods (Analysis of Variance and T Test)

样品 编号	国标方法结 果/(mg/L)	顶空气相色谱 法结果/(mg/L)
1	202	217
2	140	149
3	200	218
4	142	150
5	136	148
6	199	211

注:方差分析 F=0.37,显著水平  $\alpha = 0.05$  的 F 临界值为 4.96;

t 检验 t=0.61, 显著水平  $\alpha = 0.05$  的 t 双尾临界值为 2.23。

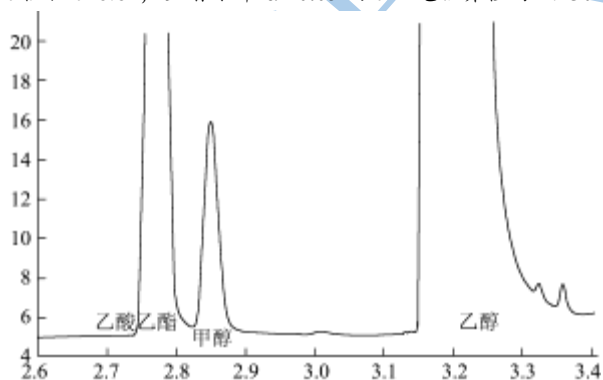


图 3 葡萄酒样品顶空气相色谱图

Fig.3 Chromatograms of wine sample

## 3 结论

3.1 本文用顶空进样模式,对葡萄酒中甲醇的顶空气相色谱分析方法进行摸索,从分流方式、载气流速、炉温、保温时间、气液相比和盐析试验 6 个方面综合

分析。结果发现:在顶空条件方面,炉温的大小对顶空浓度的影响明显,而保温时间(15 min~35 min 之间)和气液相比对甲醇的分析结果影响不明显;加入盐析剂峰形差,基线不稳。综合考虑分析效率和实际操作,得到最优的测定条件为分流进样(分流比 20:1,带 2 mm 分流衬管),载气流速 2.0 mL/min,炉温 70 °C,保温时间 15 min,测定液 5 mL,不加盐。在上述条件下,方法线性范围广,在浓度 10.2~407.6 mg/L 之间线性良好;平均回收率 99.2%,样品重现性 RSD 为 1.4%,检出限为 8.5 mg/L。

3.2 该方法的优点是不需加内标,样品不经任何处理,进样量小(以进样时间计),分析周期短,10~15min 即可,大大缩短检测时间,对色谱柱不会造成污染,灵敏度高,精密性好,准确性高,尤其适合成分复杂样品的检测,是一种简便、高效的测定葡萄酒中甲醇的方法。

## 参考文献

- [1] 梁瑞娥,韩菊,李铁军等.顶空气相色谱法测定葡萄酒中微量甲醇、乙醛的方法研究[J].河北化工,1992,2:54-57
- [2] GB/T 15038-2006.葡萄酒、果酒通用分析方法[S]
- [3] 王昊阳,郭寅龙,张正行等.顶空-气相色谱法进展[J].分析测试技术与仪器,2003,9(3):129-135
- [4] 殷林春.顶空气相色谱法快速测定化工废水中甲醇[J].辽宁城乡环境科技,2007,2,27(1):34-36
- [5] Hachenberg H, Schmidt A P. Gas Chromatographic Headspace Analysis [M]. London: Heyden and Son, 1977
- [6] Nam K C, Cordray J, Ahn D U. Automated Dynamic Headspace/GC-MS Analyses Affect the Repeatability of Volatiles in Irradiated Turkey [J]. Agric, Food Chem, 2004, 52(6): 1735-1741
- [7] 叶建晨,杨佳佩.顶空毛细管气相色谱法测定葡萄酒中甲醇残留量[J].中国卫生检验杂志,2011,6,21(6):1359-1360
- [8] 李刚,阿加古丽 赛依提.正交法优化顶空-毛细管气相色谱法测定水中甲醇的实验条件[J].干旱环境监测,2009,06, 23,(2):69-72
- [9] 黄鸣,刘江勋,黎锡流.顶空气相色谱法测深色酒中微量甲醇[J].食品科学,2002,23(2):106-108
- [10] 张琦.电解质可提高顶空气相色谱法分析灵敏度[J].环境科学导刊,2008,27(4):91-92
- [11] GB/T 5009.1-2003/食品卫生检验方法 理化部分.总则[S]
- [12] GB 15037-2006/葡萄酒[S]
- [13] 中国药品生物制品检定所编.中国药品检验标准操作规范 [Z].北京:中国医药科技出版社,2005