

顶空气相色谱法测定火龙果酒中的甲醇

李政

(广东省南方技师学院, 广东 韶关 512000)

摘要: 该文建立了一种用于测定火龙果酒中甲醇含量的顶空气相色谱法, 采用外标法定量。根据火龙果酒样品特点, 在 GB 5009.266-2016 的基础上调整优化气相色谱分离条件, 考察了顶空瓶加样体积、样品平衡温度、平衡时间对测定的影响, 筛选出最合适的顶空进样条件为: 加样体积 1mL; 平衡温度 80°C; 平衡时间 10min。对分析方法的线性、检出限、重复性、回收率进行验证, 结果表明: 该方法在甲醇浓度范围 42.21mg/L~844.20mg/L 内线性良好, $r=0.9999$; 检出限为 7.30 mg/L, 定量限为 24.36 mg/L; 重复测定 RSD 为 3.02%; 平均回收率为 100.14%。该方法与 GB 5009.266-2016 方法相比简便、高效, 可用于火龙果酒中甲醇含量的定量测定。

关键词: 顶空气相色谱; 外标法; 火龙果酒; 甲醇;

中图分类号: O657.7+1 **文献标识码:** A

Determination of Methanol in Huolong Fruit Wine by Headspace Gas Chromatography

LI Zheng

(Guangdong Southern Technician College, Shaoguan City, Guangdong Province, 512000)

Abstract: This article establishes a headspace gas chromatography method for the determination of methanol content in Huolong fruit wine, using external standard method for quantification. Based on the characteristics of Huolong fruit wine samples, the gas chromatography separation conditions were adjusted and optimized on the basis of GB 5009.266-2016. The effects of headspace bottle addition volume, sample equilibrium temperature, and equilibrium time on the determination were investigated. The most suitable headspace injection conditions were selected as follows: sample addition volume 1mL; Equilibrium temperature 80 °C; Balance time 10 minutes. The linearity, detection limit, repeatability, and recovery rate of the analysis method were verified. The results showed that the method had good linearity within the methanol concentration range of 42.21mg/L to 844.20mg/L, with $r=0.9999$; The detection limit is 7.30 mg/L, and the quantitative limit is 24.36 mg/L; The RSD for repeated measurements is 3.02%; The average

recovery rate is 100.14%. Compared with the GB 5009.266-2016 method, this method is simple and efficient, and can be used for the quantitative determination of methanol content in dragon fruit wine.

Keywords: Headspace gas chromatography; External standard method; Huolong Fruit Wine; Methanol;

火龙果原产于美洲，目前在华南地区广泛栽培，并形成了成熟的火龙果酒加工工艺^[1]，特别是红肉型火龙果酒具有一定的保健功能且营养价值十分丰富。果酒是以除葡萄以外的新鲜水果或果汁为原料，经全部或部分发酵酿制而成的发酵酒^[2]，发酵酿制的果酒一般会含有一定的甲醇，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，因此，果酒中甲醇含量有明确的限量，火龙果酒中甲醇的测定对保证其质量意义重大。

根据 GB 5009.266-2016^[3]，果酒中甲醇含量测定采用蒸馏除去样品中不挥发性物质，加入内标叔戊醇，经气相色谱分离，氢火焰离子化检测器检测，利用内标法定量。这样操作比较复杂，前处理时间、分析时间均较长，工作效率比较低。

顶空气相色谱法将液体或固体样品中的挥发性组分收集后直接导入气相色谱仪进行分离和检测，这样可以免除冗长烦琐的样品前处理过程，避免有机溶剂带入的杂质对分析造成干扰，减少对色谱柱及进样口的污染。近年来，随着自动顶空进样器的国产化及随之而来的价格下降，顶空色谱技术以其简单实用的优点越来越广泛的应用于环境检测、酿酒业分析^[4]、食品、法庭科学、石油化工、包装材料、涂料及药物中有机残留溶剂检测^[5]等领域。

火龙果酒香气浓郁，其中含有大量挥发性酯类、有机酸类、醇类等挥发性有机物质^{[6][7]}，甲醇含量较低。本文采用顶空气相色谱法测定，外标法定量，在优化色谱分离条件的基础上，通过对气相色谱顶空进样多种条件进行筛选，从顶空瓶加样体积、样品的平衡温度、平衡时间三个方面进行考察，建立火龙果酒中甲醇测定的顶空气相色谱法。

1 材料与方法

1.1 仪器

GC-2010Plus 气相色谱仪，SPL 进样口，2mm 衬管和 FID 检测器，日本岛津公司；GC Labsolution 色谱工作站，日本岛津公司；HS-27A 自动顶空进样器（27 位进样瓶和 6 位保温槽），20mL 顶空进样瓶（带聚四氟乙烯样品瓶隔垫）；上海思达分析仪器有限公司；SK-WAX 毛细柱 30 m×0.25 mm×0.25 μm，日本岛津公司；PURELAB Flex 超纯水机，埃尔格公司；HYC-390 医用冷藏箱，青岛海尔特种电器有限公司；EL104 电子天平，梅特勒托利多公司；100-1000μL 移液枪，北京大龙。

1.2 试剂

无水乙醇，分析纯，99.7%，天津市大茂化学试剂厂；甲醇，色谱纯，99.9%，美国天地有限公司；火龙果酒，750mL/瓶，广东某农场；试验用水为一级水。

1.3 仪器工作条件

1) 顶空进样条件

(1) 温度参数：平衡温度 80℃；针头温度 85℃；定量管温度 90℃；传输管温度 100℃。

(2) 时间参数：平衡时间 10min；加压时间 0.10min；充样时间 0.05min；充样平衡时间 0.05min；进针时间 0.20；清扫时间 1.00min；循环时间 10min。

(3) 气体调节参数：载气流速 30psi。

2) 气相色谱条件

载气：高纯氮气；载气流速：1.5 mL/min；载气控制方式：线速度；进样口温度：200℃；分流比设为 1；柱温程序：40℃保持 3min，40℃/min 升温至 150℃，保持 1min；检测器温度：250℃；尾吹：30mL/min；空气流速：400mL/min；氢气流速：40mL/min。

1.4 溶液的配制

1) 溶剂的配制

乙醇溶液（10%，体积分数）：量取 50mL 无水乙醇于 500mL 容量瓶内，再用纯水定容至刻度，混匀，现配现用（火龙果酒酒精含量在 10% 左右，故采用 10% 的乙醇溶液作为溶剂）。

2) 对照品溶液的配制

准确称取甲醇 0.4221g 至 100mL 容量瓶中，用 1.4 1) 的乙醇溶液稀释定容至刻度，混匀，浓度为 4221mg/L，作为对照品储备液，0℃~4℃低温冰箱密封保存。分别准确吸取对照品储备液 0.50mL、1.00mL、2.00mL、4.00mL、8.00mL、10.00mL，于 6 个 50mL 容量瓶中，用 1.4 1) 的乙醇溶液定容至刻度，依次配制成 42.21mg/L（1#）、84.42mg/L（2#）、168.84mg/L（3#）、337.68mg/L（4#）、675.36mg/L（5#）、844.20mg/L（6#）对照品溶液标准系列，现配现用。

1.5 试验方案

为确定并验证最适宜分析火龙果酒中甲醇含量的顶空气相色谱方法，本文首先优化火龙果酒样品气相色谱分离条件，然后优化顶空瓶加样体积、样品的平衡时间、平衡温度等自动顶空进样器操作条件，再从线性、检出限、重现性、加标回收率四方面对方法进行评价。

2 结果与分析

2.1 测定条件的优化

1) 气相色谱分离条件

试验过程参照 GB 5009.266-2016 设置气相色谱仪起始分离条件条件，采用 1.4 2) 中 4# 对照品标准溶液定位甲醇位置，顶空进样条件为顶空瓶加样体积 1mL，平衡温度 70°C，平衡时间 3min。反复进火龙果酒原始样品来调整、验证、优化气相色谱分离条件。

主要优化措施如下：

(1) 试验发现载气流速对甲醇峰分离度影响不大，把载气流量从 1.0mL/min 调整为 1.5mL/min，以缩短分析时间。

(2) 由于采用顶空进样，样品中含有的高沸点物资较少，把进样口温度从 250°C 调整为 200°C。

(3) 试验发现火龙果酒样品中甲醇含量较低，为了提高样品响应值，把分流比从 20 : 1 调整为 1 : 1。

(4) 最后调整色谱柱箱升温程序，升温程序必须保证样品中甲醇完全分离，且样品中共存组分要全部流出色谱柱，本方法采用的是 30m 长的 WAX 色谱柱，须延长低温停留时间至 3min 以保证甲醇分离效果，再以 40°C/min 升温至 150°C，并保持 1min，加快并保证其他物资充分流出色谱柱，同时提高分析效率。经此优化，整个柱箱温度程序为 6.75min。

在 1.3 2) 所示的优化后气相色谱条件下，测得 4# 对照品标准溶液和火龙果酒样品色谱图如图 1 所示：图中保留时间 3.0min 的色谱峰为甲醇，黑色线是 4# 对照品标准溶液色谱图，紫色线是火龙果酒样品色谱图。

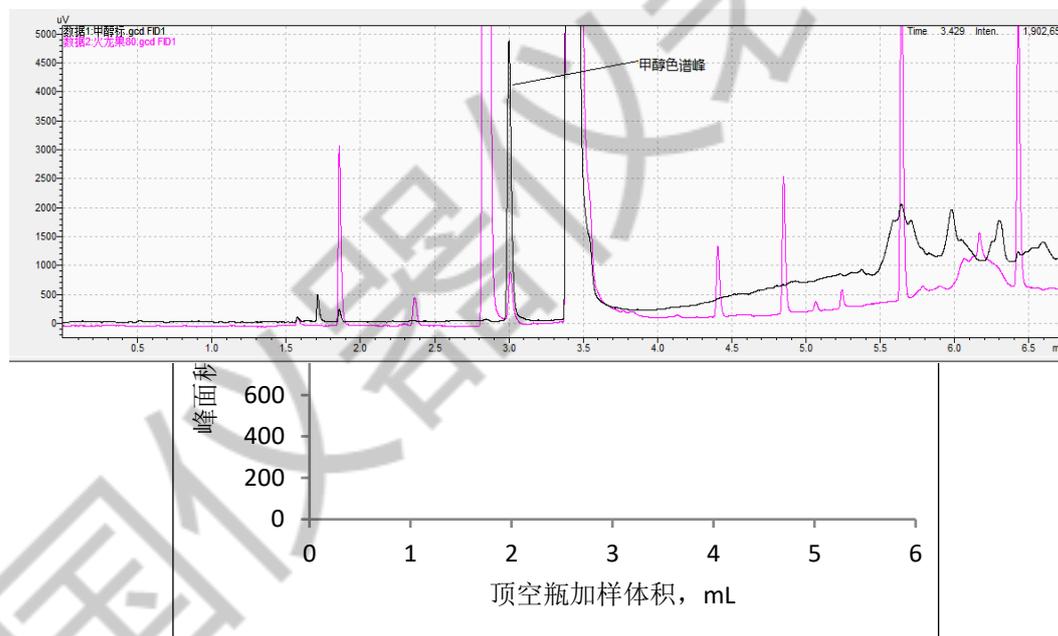


图 1 4# 对照品标准溶液和火龙果酒样品色谱图

图 2 顶空瓶加样体积与甲醇峰面积关系曲线

2) 顶空瓶加样体积

分别取 1、2、3、4、5mL 同一火龙果酒样至顶空瓶中，在 1.3.2) 所示的气相色谱条件和相同顶空条件下（平衡温度 70℃，平衡时间 3min，20mL 顶空进样瓶）进行试验，测得顶空瓶加样体积与色谱图中甲醇峰面积关系如下图 2 所示。

由图可知，由于甲醇的亨利常数小，改变加样体积对甲醇顶空气相浓度影响很小，所得峰面积变化不明显。为减少检测样品量，本方法选择 1mL 作为顶空瓶最佳加样体积。

3) 样品的平衡时间

样品的平衡时间对检测结果影响很大，平衡时间过短，样品挥发不完全，导致检测响应值下降，平衡时间过长，影响检测效率。试验过程为：分别取 1mL 同一火龙果酒样至 5 个顶空瓶中，选择平衡时间分别为 3min、5min、8min、10min、15min，在 1.3.2) 所示的气相色谱条件和相同顶空条件下（平衡温度 70℃）进行试验，分析结果见表 1。

表 1 同一样品不同平衡时间甲醇分析结果

平衡时间	3min	5min	8min	10min	15min
峰面积, μV	1006	1362	1493	1459	1565

由表中数据可知：平衡时间在 3min 至 8min 内，测得色谱图甲醇峰面积随平衡时间延长增加明显；平衡时间在 8min 至 15min 之间，测得色谱图甲醇峰面积增加不多，基本保持稳定。综合考虑，本方法选择 10min 为样品的平衡时间，此时，进样瓶中基本达到气液平衡，既可以保持本方法具有足够的检出限，又尽可能节约了测定时间。此外，本方法一个样品完成色谱图数据采集需要 6.75min，加上气相色谱仪回到初始就绪状态所需时间，大概是 10min。所以，本方法将自动顶空进样器循环时间设置为 10min，可以保证前一个样品测定完成，气相色谱仪刚回到就绪状态，下一个样品正好完成平衡可以进样，减少了样品间等待的时间。

4) 样品的平衡温度

火龙果酒中水含量教大，温度过高使较多水汽进入色谱柱，极性很强的水分子对大部分气相色谱毛细管柱固定相有较强的破坏性，引起柱流失，导致柱效下降。考虑到甲醇的沸点为 64.7℃，本试验在甲醇沸点正负 15℃范围内 6 个温度点比较不同平衡温度对火龙果酒中甲醇含量测定的影响。具体试验方法为：分别取 1mL 同一火龙果酒样至 6 个顶空瓶中，设置平衡温度分别为 55、60、65、70、75、80℃，在 1.3.2) 所示的气相色谱条件和相同的其他顶空条件下（平衡时间 10min）进行试验测定，分析结果见下表 2。

表 2 同一样品不同平衡温度分析结果

平衡温度	55℃	60℃	65℃	70℃	75℃	80℃
峰面积, μV	842	870	1252	1459	1823	2088

由表中数据可知：甲醇峰面积与平衡时间成正比，温度越高，得到色谱峰面积越大，符合亨利定律。考虑到火龙果酒中甲醇含量较低，选择较高的平衡温度可以提高样品响应值，故本方法选择 80℃为顶空进样器中样品的平衡时间。

2.2 方法评价

1) 线性

分别准确吸取 1.4.2) 对照品标准系列溶液 1#~6# 各 1.00mL 至 6 个顶空瓶中，迅速盖紧，按 1.3 测定条件分析，以峰面积 Y 为纵坐标，对照品标准系列溶液浓度 X 为横坐标，绘制标准曲线，得线性回归方程为 $Y=49.0320X-115.289$ ， $r=0.9999331$ ，可见在此方法条件下进行试验，样品中甲醇在 42.21mg/L~844.20mg/L 范围内线性关系良好。图 3 为工作站绘制外标法标准曲线。

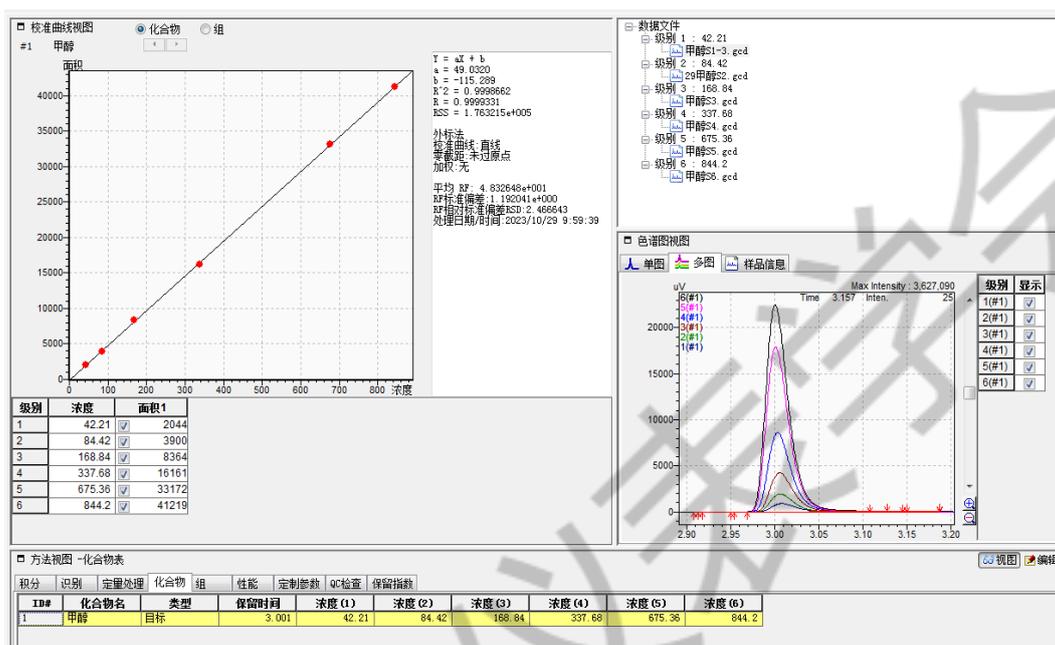


图 3 外标法标准曲线图

2) 方法检出限

GB/T 5009.1-2003^[8]中色谱法的检出限计算方法为：

$$\text{检出限} = \frac{\text{最低相应值}}{b} = \frac{S}{b}$$

式中，S 为仪器噪音的 3 倍；b 为标准曲线回归方程中的斜率。

本试验采用 GC Labsolution 工作站自带的 QAQC 参数设定功能，利用 1.4.2) 对照品标准系列溶液 1#~6# 色谱图数据，采用信噪比关系来确定检测限和定量限。设定噪音 (ASTM) 计算方法为工作站自动识别基线计算，计算数据见图 4。

噪音 (ASTM)

计算方法 自动识别基线计算

[结果]

ID	化合物名	级别1 S/N	级别2 S/N	级别3 S/N	级别4 S/N	级别5 S/N	级别6 S/N	检测限(DL)	定量限(QL)
1	甲醇	13.093381	32.379315	70.317131	133.926498	273.596010	318.334979	7.306994	24.356648

图 4 甲醇测定方法检出限计算结果 1

由表可知，本方法检出限为 7.30 mg/L，定量限为 24.36 mg/L，与 GB 5009.266-2016 方法检出限 7.5mg/L，定量限为 25mg/L 相当，因此所建立的顶空气相色谱法可以满足检测要求。

如果设定噪音(ASTM)计算方法色谱图开始时间 0min，结束时间 1min，间隔 0.1min，检测限和定量限还会更小，计算数据见图 5。

噪音(ASTM)									
计算方法		指定时间							
开始时间 [min]	结束时间 [min]	间隔 [min]							
0.00	1.00	0.10							
[结果]									
ID	化合物名	级别1 S/N	级别2 S/N	级别3 S/N	级别4 S/N	级别5 S/N	级别6 S/N	检测限(DL)	定量限(QL)
1	甲醇	77.841008	202.581199	384.724161	1099.584883	1694.804723	2114.628210	1.148601	3.828670

图 5 甲醇测定方法检出限计算结果 2

3) 精密度试验

分别准确吸取同一瓶火龙果酒样品各 1mL 至 6 个顶空瓶中，迅速盖紧，按 1.3 测定条件分析，利用 2.2 1) 所得标准曲线计算得到被测火龙果酒样品中甲醇平均含量为 43.69mg/L，RSD=3.02%，表明方法的重复性良好，6 次测定的极差相对值为 7.32%，满足 GB 5009.266-2016 在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过其算术平均值的 10% 的要求。精密度试验具体测定数据见图 6。

数据值 6												
数据	数据文件路径	样品名	样品ID	分析日期/时间	数据文件的状态							
数据1:	D:\2023.10火龙果酒中甲醇含量测定\火龙果样1-1.gcd			2023/10/28 19:54:09	Normal							
数据2:	D:\2023.10火龙果酒中甲醇含量测定\火龙果样1-2.gcd			2023/10/28 20:06:40	Normal							
数据3:	D:\2023.10火龙果酒中甲醇含量测定\火龙果样1-3.gcd			2023/10/28 20:19:12	Normal							
数据4:	D:\2023.10火龙果酒中甲醇含量测定\火龙果样1-4.gcd			2023/10/28 20:31:43	Normal							
数据5:	D:\2023.10火龙果酒中甲醇含量测定\火龙果样1-5.gcd			2023/10/28 20:44:14	Normal							
数据6:	D:\2023.10火龙果酒中甲醇含量测定\火龙果80.gcd			2023/10/28 15:27:34	Normal							
结果(级别 0)												
ID	化合物名	数据1 浓度	数据2 浓度	数据3 浓度	数据4 浓度	数据5 浓度	数据6 浓度	最小 浓度	最大 浓度	平均 浓度	浓度 标准偏差	浓度 %RSD
1	甲醇	43.909550	42.084969	43.652532	45.279132	42.272882	44.928447	42.084969	45.279132	43.687919	1.318561	3.018137

图 6 精密度试验结果

4) 准确度试验

本方法采用加标回收率试验来验证方法准确度，按照第三方检测行业规范，加标回收试验，加标量在 0.5 到 2 倍之间。本试验按照 50%、100%、200% 加标，在 1.3 测定条件下分别重复测定 3 次，计算低、中、高 3 个浓度下的回收率。具体操作为：分别准确吸取同一瓶火龙果酒样品各 5mL 至编号为 B1~B12 的 12 个 10mL 容量瓶中，B1~B3 直接加 1.4 1) 的溶剂，稀释定容至 10mL，用来确定 5mL 火龙果酒样品所含甲醇质量；B4~B6 按照 50% 加标，先各加 1.4 2) 中 2# 对照品标准溶液 1.50mL，再用 1.4 1) 的溶剂定容至 10mL；B7~B9 按照 100% 加标，先各加 1.4 2) 中 2# 对照品标准溶液 3.00mL，再用 1.4 1) 的溶剂定容至 10mL；B10~B12 按照 200% 加标，先各加 1.4 2) 中 3# 对照品标准溶液 3.00mL，再用 1.4 1) 的溶

剂定容至 10mL。配制完成后从 B1~B12 的容量瓶中各取 1mL 样品溶液加到顶空进样瓶中，按 1.3 测定条件分析，结果见表 3。

表 3 火龙果酒中甲醇加标回收率试验

样品 编号	加标 量， μg	测定结 果 mg/L	测得甲 醇总质 量， μg	5mL 酒	5mL 酒	回收 率， %	平均回收 率， %	RSD， %
				样含甲 醇质 量， μg	样含甲 醇质量 均值， μg			
B1	\	21.58	215.8	215.8				
B2	\	22.14	221.4	221.4				
B3	\	22.61	226.1	226.1				
B4	126.63	34.10	341			94.69		
B5	126.63	33.86	338.6			92.79		
B6	126.63	34.81	348.1			100.29		
B7	253.26	47.86	478.6		221.1	101.67		
B8	253.26	47.22	472.2	\		99.15	100.14	5.12
B9	253.26	46.35	463.5			95.71		
B10	506.52	74.55	745.5			103.53		
B11	506.52	76.98	769.8			108.33		
B12	506.52	75.35	753.5			105.11		

由表中数据可知，测得回收率在 92.79%~108.33%之间，平均回收率为 100.14%，RSD 为 5.12%，本法回收率良好。从表中数据还可以看出，接近 100%加标测得回收率要优于 50%、200%加标测得回收率。

3 结论

3.1 本文对自动顶空进样气相色谱法测定红心火龙果酒中甲醇含量进行了试验摸索，在 GB 5009.266-2016 的基础上调整优化气相色谱分离条件，考察了顶空瓶加样体积、样品平衡温度、平衡时间对测定的影响。综合考虑分析效率和样品情况，优化后的主要仪器工作条件为：载气流速：1.5mL/min；进样口温度：200 °C；分流比 1: 1；柱温为在 40°C保持 3min，以 40°C/min 升温至 150°C，保持 1min；顶空瓶加样体积 1mL，样品平衡温度 80°C，平衡时间 10min。在此条件下，本方法在甲醇浓度范围 42.21mg/L~844.20mg/L 内线性良好， $r=0.9999$ ；检出限为 7.30 mg/L，定量限为 24.36 mg/L；火龙果酒样测定平均值为 43.69mg/L，重复测定 RSD 为 3.02%，平均加标回收率为 100.14%。该方法采用外标法定量，样品不需要前处理直接测定，是一种简便、高效的测定龙果酒中甲醇含量的方法。

3.2 在试验过程中，为了保证分析数据的准确性，要注意以下操作细节：试验对照品溶液要现配现测，特别是高浓度的对照品溶液加到顶空瓶中后，要迅速加盖密封并及时测定，

若时间过长容易导致顶空瓶中气液平衡条件不一致，引起误差；不要用移液枪直接在顶空瓶内配制样液，容易产生体积误差，对系列标液、加标样，要使用容量瓶定容配制后再统一转移到顶空瓶中测定。

参考文献

- [1] 郭芬, 吴坚, 马巾媛. 火龙果果酒加工[J]. 现代食品, 2017(21): 110-113.
- [2] 绿色食品 果酒: NY/T 1508-2017[S]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [3] 食品安全国家标准 食品中甲醇的测定: GB 5009.266-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [4] 曾游, 丁怡. 顶空-毛细管气相色谱法测定葡萄酒中的甲醇[J]. 现代食品科技, 2013, 29(02): 405-408.
- [5] 沈丽宫, 何文胜, 刘文君, 等. 顶空气相色谱法测定紫草素中的乙醇残留[J]. 福建分析测试, 2021, 30(3): 7-13.
- [6] 殷俊伟, 龚霄, 王晓芳, 等. 红心火龙果果酒挥发性成分分析[J]. 中国酿造, 2016, 35(09): 159-162.
- [7] 李凯, 王金晶, 李永仙, 等. 红心火龙果果酒特征香气分析[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(13): 217-223.
- [8] 食品卫生检验方法 理化部分 总则: GB/T 5009.1-2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.