

## 內標準校正氣相層析法分析稀釋液體中之酒精濃度

陳良宇\*、陳雅芳、陳怡伶、徐品家

銘傳大學生物科技系生物系統工程實驗室 中華民國 台灣 桃園

(收稿日期：98年6月30日；接受日期：98年7月9日)

### 中文摘要

酒精的使用與我們的生活習習相關，而酒精發酵可說是目前最古老也最具規模的生物科技產業，如何判斷發酵程序與產品已達到預定的標準，其酒精濃度的測量是產業中很重要的課題。本研究運用氣相層析法進行液體樣品中的酒精濃度分析，以內標準品添加法提高此分析方法的可靠性與適用性，建立快速(每一樣品 10 分鐘)、高精密度( $\pm 0.3\%$ )及廣泛可偵測濃度範圍(99.5%~0.05%)的酒精分析方法。並對此化學分析方法進程序的確效和驗證，更教育學生瞭解定性與定量分析技術的應用與演練範例。

關鍵字：酒精分析；乙醇；異丙醇；氣相層析；內標準品校正。

### 緒論

酒精充斥在我們的生活當中，在食品、交通運輸業、化學工業、醫療、衛生及科學的研究上，有著廣泛的用途，並與我們的生活息息相關。酒精發酵工業可說是目前最古老也最具規模的生物科技產業，其產量居世界技術產品之首。在能源價格高昂的現代人類社會中，酒精的最大需求為供燃料使用之生質酒精，其次為酒類飲料調製為主的食用酒精，再次為化學工業和醫藥產業中溶劑及消毒用途的酒精。

酒精是一種無色、透明、易揮發具有特殊芳香與強烈刺激味道的易燃

液體。酒精的化學名稱是乙醇(Ethanol)；分子式為  $C_2H_5OH$ ；相對分子質量是 46.07；相對密度為 0.7893；沸點  $73.8^\circ C$ ；凝固點  $-117.3^\circ C$ 。與水互溶，可提高水溶液之疏水性(Hydrophobic property)並可以做為抗凍劑使用。由於其沸點與燃點低，所以容易揮發，當乙醇蒸氣與空氣混合時，即形成爆炸型混合物，爆炸危險濃度為 3.3%-19%(體積)。

在許多國家的財稅制度中，酒精含量越高的飲品，所課的稅率將會越高<sup>[1]</sup>。除此之外，在燃料工業、法庭鑑識科學(法醫學, Forensics)<sup>[2]</sup>、化工及醫藥產業<sup>[3]</sup>的應用上，酒精含量(純度)的檢測也有廣泛且迫切的需求。因

\*通訊作者：陳良宇 [lokmath@mail.mcu.edu.tw](mailto:lokmath@mail.mcu.edu.tw)

此，開發迅速、方便、準確且可信賴的酒精濃度分析方法是重要的工作。

檢測溶液中酒精含量的方法有很多種，例如：滴定法、酵素分析法<sup>[2,4]</sup>、電化學量測法<sup>[2]</sup>、近紅外光譜法<sup>[5-7]</sup>、液相層析 (liquid chromatography)<sup>[1,2]</sup>及氣相層析法(gas chromatography)<sup>[2,3,8]</sup>等。上述這些方法，都具有一定的精確度及實用價值。然而，就方法開發而言，以滴定及酵素催化為基礎的分析方法需要較大量的樣品，做為最終結果的判別；近紅外光譜及液相層析法之解析度較差，僅適用於特定樣品的線上品管監測；而除了滴定法外，其他均需要昂貴的儀器設備及技術能力。因為乙醇具有高揮發性，本研究選擇操作較簡易、快速、檢體樣品量小和適合大量樣品檢驗之氣相層析-火燄游離偵測法為基礎，並加以改善實際的分析程序步驟，以評估樣品中酒精濃度的精準度，期待能夠建立更正確可靠的實驗方法。

## 材料與方法

### 實驗藥品及溶劑

甲醇(Methanol)、乙醇、異丙醇(Iso-Propanol)及氰甲烷(Acetonitrile)為購自默克公司(Merck, 德國)之溶劑及標準品。本實驗所使用之有機化學溶

劑均為超純級及液相層析級，純度大於 99.5%，直接使用沒有再純化。稀釋用之溶劑水為去離子超純水(Barnstead, 德國)，電阻大於 18 M-Ohm。

以乙醇(99.5%)和超純水混合分別稀釋兩種高、低濃度範圍的酒精標準溶液，高濃度：5%、10%、15%、20% (v/v)以及低濃度：0.05%、0.1%、0.5%、1%。並配製含有 10% (v/v)異丙醇內標準品之乙醇標準溶液，乙醇序列濃度同上。20%乙醇標準溶液及 10%異丙醇標準溶液為儲備溶液。

測試樣品為實驗室自行釀造之桑椹紅酒(Mulberry wine)、啤酒(Beer)及兩種蒸餾酒(Liquid-A, Liquid-B)，由銘傳生科系鄭建璋及梁致遠教授提供。

### 氣相層析分析

本實驗使用氣相層析儀(TRACE GC Ultra, Thermo Electron Corp., 義大利)，搭配火燄游離偵測器(Flame ionization detector, FID)及液體進樣器(AI-3000 autoinjector)。氣相層析之毛細管柱為Rtx-WAX (60 m × 0.53 mmid × 1 μm, RESTECK, USA)。攜行氣體為氮氣，固定流速為 2 ml/min；分流(Split)比為 30；進樣口(Inlet)溫度：250°C；偵測器操作溫度：150°C；液體樣品注射量為 1 micro-liter。

升溫程序：初始溫度 70°C 保持 1 min，然後以 10°C/min 的速率上升到

150°C，保持10 min。所有資料均收集並記錄於電腦檔案系統中，訊號分析及定量積分軟體為 Chrom-Card (Thermo Electron Corp., 義大利)。

#### A. 穩定度試驗

超純水、酒精濃度 1% 的標準溶液及稀釋 20 倍的桑椹紅酒 (Mulberry wine) 做為氣相層析法分析穩定度的測試樣品，依序為基線空白確認(2 超純水)、酒精標準溶液及桑椹紅酒(-1)、連續分析(-2, 3, 4)及間隔分析(-5)。

#### B. 外標準品法之同日內及異日間測試

將低濃度範圍的酒精標準溶液進行同日內測試 (Intra-day test)，在 24 小時期間，每個濃度重複注射三次。而異日間測試 (Inter-day test) 為 7 天內注射三次，每次間隔 24 小時以上。

#### C. 內標準品法之準確度評估

以乙醇(99.5%)和超純水混合分別配製高濃度範圍的酒精標準溶液，並含有固定濃度之 5% (v/v) 異丙醇內標準品添加入所有酒精測試樣品中。所有樣品進入氣相層析儀分析前均稀釋 25 倍，以降低背景干擾。

#### D. 酒精飲品分析

我們使用四種實驗室自產酒精飲品，分別是桑椹酒、啤酒和兩種濃度不同的蒸餾酒，所有的樣品均添加 5%

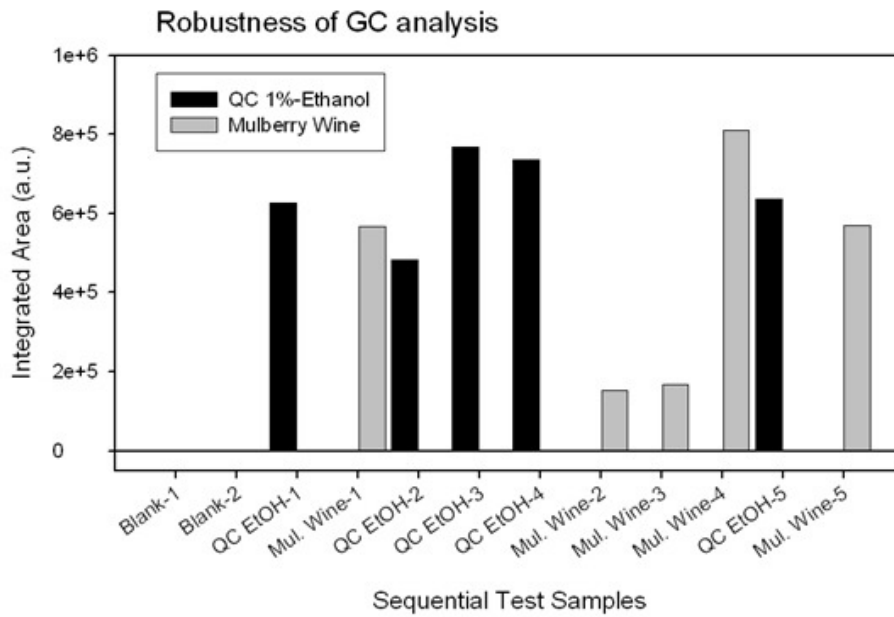
濃度的異丙醇，並同樣稀釋 25 倍至內標準品濃度為 0.2%。氣相層析儀分析後計算波峰積分面積，依內標準品檢量線可估算出酒類飲料的酒精含量。

### 結果與討論

#### 穩定度試驗

氣相層析法，是一種靠著將試樣氣化，藉著另一攜行氣體(如氮，氫，或氦)混合帶動，通過微細的管柱將各別成份加以分離。由於管柱中具備大面積的特定物理性質的固相或液相薄膜界面，化學分子在此薄膜界面上進行不同的交互作用，也就是氣/固相或氣/液相界面(G/S or G/L interfaces)的分配，造成分子移動速率上的差異，導致成份的分離。再藉由已知濃度之化學標準品進行比對分析，可以對特定的物質進行定性與定量的研究分析。

以高純度乙醇配製之溶液和樣品進行分析，其結果如圖一所顯示。1% 乙醇品管樣品(QC 1%-Ethanol)共分析五次，乙醇訊號的滯留時間為  $6.635 \pm 0.018$  min (以 99% 的信賴水準  $\pm 3$  倍標準偏差)，顯示此氣相層析法具優良的定性能力。然而訊號強度差異達到 20% 以上，顯示定量分析的穩定度不佳。桑椹酒樣的分析也呈現良好



圖一：液態樣品之氣相層析法乙醇濃度測定。共有四個樣品：超純水為空白 (Blank)、乙醇標準溶液(QC 1%-Ethanol)、稀釋 20 倍之未過濾桑椹酒 (Mulberry Wine)及另一位分析人員配製之稀釋 20 倍未過濾桑椹酒(Mul. Wine-5)，樣品名稱後方編碼為分析次序。

的定性但很糟的定量結果，桑椹酒-1 及-5 為不同人員前處理與配製的樣品，卻顯示良好的穩定度。綜合以上結果，我們推論氣相層析儀分析高揮發性溶劑時，與注射口(inlet zone)之液體氣化與移轉效率有關。

後續我們針對低濃度之乙醇標準溶液(小於 1%-EtOH)，進行同日間、異日間的精密度評估，以探討是哪些內在或外在因子將造成氣相層析法的不穩定。其結果如表一所示，同日內分析的結果顯示較異日間分析更好的精密度。而同日內分析的數據更顯示，越低濃度的乙醇標準溶液具有更好的精密度。

排除人為操作的差異，藉由其他實驗條件的改變，我們認為高揮發性物質的分析是造成低定量再現性的主要原因。溫度、氣化速率與氣密性將影響實際進入層析管柱分離的(質)量，尤其是高濃度的乙醇溶液，其偏差應該會越明顯。然而，傳統外標準檢量線法(External Standard Calibration)的使用並不適合於低再現能力(Low repeatable)的分析程序和低濃度的分析樣品。在本研究中，我們必須提高注射區的溫度、樣品注射量及注射速率的控制穩定度(自動化精密度)，氣體

表一：比較同日內與異日間測試之方法穩定度，同日內測試為單一樣品重複分析三次，而異日間測試為同一樣品於不同日(1, 3, 5)分析且每次為三重複。

	乙醇濃度	偵測訊號/積分面積(a.u.)	精密性/變異係數 <sup>#</sup>
同日內 (n=3)	1 %	2455764 ± 204261	8.3 %
	0.5 %	1239211 ± 62774	5.1 %
	0.1 %	256195 ± 11173	4.4 %
	0.05 %	126486 ± 1310	1.0 %
異日間 (n=9)	1 %	4311957 ± 2735422	63.4 %
	0.5 %	1351562 ± 81892	6.1 %
	0.1 %	248595 ± 31736	12.8 %
	0.05 %	127696 ± 61131	47.9 %

<sup>#</sup>變異係數(CV)：標準偏差/平均值 × 100%，可視為分析精密度的指標之一。

分流的時間與設備設計上的精確度，才能改善此一問題，這代表更昂貴的設備與耗材成本的增加。

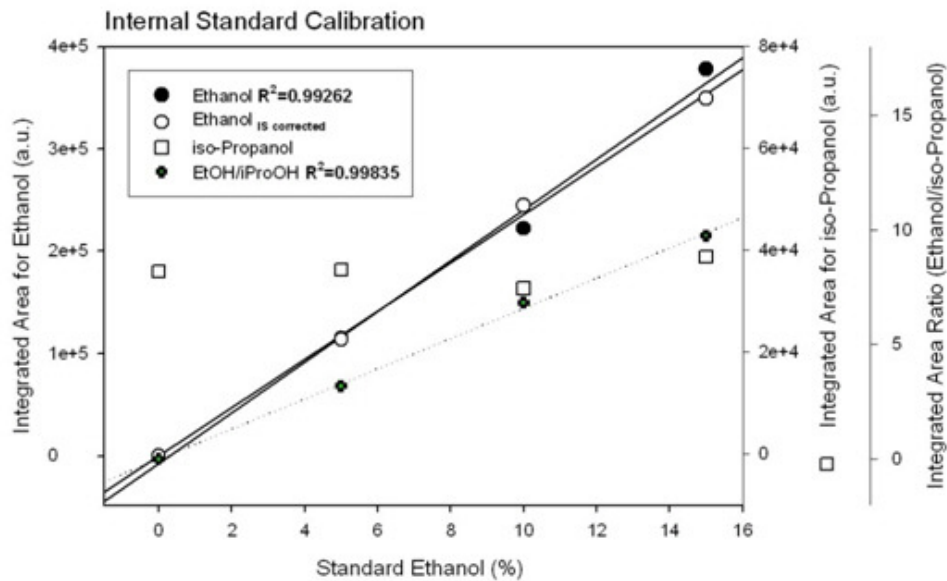
#### 樣品稀釋與內標準品定量校正

分析樣品的稀釋將是降低揮發性成份氣化效率的重要方法，因此，內標準品定量的使用應該是實務上比較可行有利的酒精定量方法。本研究選擇一般釀造酒類含量很少的異丙醇(Iso-Propanol)做為乙醇分析時之內標準品，且將分析樣品及標準品均稀釋相同倍數，降低基質干擾及分析物揮發氣化的速率。單一分析程序下，我們可以得到乙醇及異丙醇之訊號強度，由圖二所示，乙醇量測訊號-●-隨濃度上升而增加，並呈現簡單的線性關係(外標準檢量線)：  
 $Y=24809.4X-7317.4$ 。

異丙醇是固定濃度的內標準品，

所以訊號強度-□-呈現相近的結果。利用內標準品訊號強度的改變，可以評估在當次分析時醇類氣化的效率，所以我們用乙醇/異丙醇訊號比值對乙醇濃度進行迴歸分析，得到更好的迴歸相關性。而將此比值回乘固定常數(異丙醇的平均訊號強度)，得到修正的乙醇量測訊號-○-，具有相同的迴歸相關性及線性關係(內標準檢量線)：  
 $Y=23577.1X+143.1$ 。

比較檢量線之相關性( $R^2$ )顯示內標準校正法可以提高定量的穩定度與精密性(Stability and precision)，原有10%乙醇標準溶液的訊號偏低遠離線性迴歸線，而內標準異丙醇的訊號也明顯偏低，故修正後可降低訊號之線性迴歸殘差。比較檢量線之截距更顯示內標準校正法可以提高分析方法的



圖二：不同乙醇濃度及異丙醇內標準品之檢量線。標準乙醇溶液(% w/v)之訊號積分面積-●-，及固定濃度之異丙醇的訊號積分面積-□-，以及以內標準品法修正過後之乙醇訊號積分面積-○-。內標準品法修正過後之乙醇檢量線 (Ethanol IS corrected)和比值(EtOH/iProOH)檢量線的線性相關係數 ( $R^2=0.99835$ )均相同。

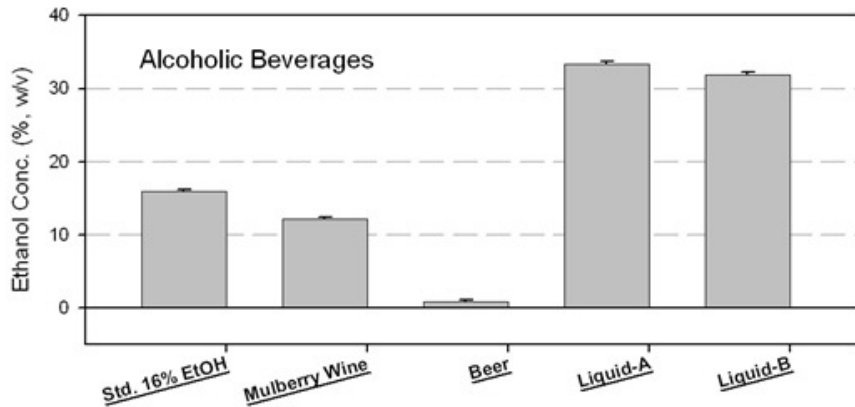
空白精準度(Accuracy in blank)，外標準檢量線所得之空白限量(截距/斜率的絕對值)為 0.1498%的酒精濃度，而內標準品法校正之空白限量為 0.0061%的酒精濃度，使分析低濃度樣品具有較小的分析誤差，並降低定量極限(QL)達 24.6 倍。至此，我們確認內標準品添加能改善氣相層析在高揮發性成份上之定量分析可靠性，更可擴大定量分析能力的適用濃度範圍。

#### 自製酒類飲品之乙醇定量結果的比較

由穩定度及精密度試驗的結果，我們將內標準品定量跟氣相層析法結合，用以量測實驗室自製酒類飲品的

酒精濃度，其結果詳見圖三。

工業上分析酒精度的方法，大多為單一產品之品管措施，例如：折射度計與比重瓶法。雖然，操作較為簡便快速，但可溶性的糖(固形物)及色素，均會對不同酒類的酒精度比較產生誤差。上述樣品以啤酒 23 較為混沌，推測發酵完成度並不高，其酒精度也僅於 1%左右，遠低於折射度計法的結果。而蒸餾酒之濃度與比重瓶法出來的結果相近，卻低於折射度計法的結果，我們推測這應該跟使用紅酒專用(本實驗室)的折射度計有關。而過濾後之酒類樣品雖可得到與比重瓶法



圖三：實驗室自製各酒類飲品之酒精含量分析。桑椹酒為  $12.2 \pm 0.2\%$  (w/v)、啤酒為  $0.82 \pm 0.2\%$ 、蒸餾酒 A 及 B 分別為  $33.34 \pm 0.43\%$  及  $31.87 \pm 0.51\%$ 。

相近

之結果，但因乙醇的相對比重為水的 79%，比重瓶法並不適合用於低酒精含量的樣品，對低發酵啤酒中乙醇濃度的定量解析度不佳。

針對低酒精濃度的樣品，本法僅需降低稀釋倍數，就可以獲得較大的訊號回應(Signal response)，而較高酒精濃度的樣品，則可藉由水的稀釋來降低基質干擾<sup>[9]</sup>並以氫鍵作用力降低乙醇的逸散潛力(Fugacity)。此外，氣相層析儀注入口的氣化室(Liner)更因為樣品組成為>95%的水，液體氣化冷卻時，系統所供應之氣化熱(焓)較為穩定，自動化精密度將提昇。

### 結論

雖然公認的檢測酒精方法有很多種，但多數僅適用於特定製程與濃度範圍的樣品。氣相層析法在揮發性物質的定性分析上具有卓越的效能，結合內標準品的定量校正，我們能建立一精度與準度俱佳，且快速、廣泛適用的分析方法。此研究的目的，不僅在於開發釀造產品與技術時，提供可靠的指標分析法，更教育學生瞭解定性與定量分析技術的應用範例。

### 參考文獻

- [1] Kuo CC, Wen YH, Huang CM, Wu HL, Wu SS: A removable derivatization HPLC for analysis of methanol in chinese liquor medicine. Journal of Food and Drug Analysis 2002, **10**:101–106.

- [2] Tagliaro F, Dorizzi R, Ghielmi S, Marigo M: Direct injection high performance liquid chromatographic method with electrochemical detection for the determination of ethanol and methanol in plasma using an alcohol oxidase reactor by gas chromatography with direct on-column injection. *J Chromatography* 1991, **566**:333–339.
- [3] Morris-Kukoski CL, Schaff-Jason JEE, LeBeau MA: Ethanol analysis from biological samples by dual rail robotic autosampler. *J Chromatography B* 2007, **850**:230–235
- [4] Mizgunova UM, Zolotova GA, Dolmanova IF: Enzymatic method for the determination of ethanol and methanol with spectrophotometric detection of the rate of the process. *Analyst* 1996, **121**:431–433.
- [5] Van den Berg FWJ, van Osenbruggen WA, Smilde AK: Process analytical chemistry in the distillation industry using near-infrared spectroscopy. *Process Control Quality* 1997, **9**:51–57.
- [6] Pasquini C, Scafi SHF: Real-time monitoring of distillations by near-infrared spectroscopy. *Analytical Chemistry* 2003, **75**:2270–2275.
- [7] Buchanan BR, Honigs DE, Lee CJ, Roth W: Detection of ethanol in wines using optical-fiber measurements and near-infrared analysis. *Applied Spectroscopy* 1988, **42**: 1106–1111.
- [8] Wang ML, Wang JT, Choong YM: Simultaneous quantification of methanol and ethanol in alcoholic beverage using a rapid gas chromatographic method coupling with dual internal standards. *Food Chemistry* 2004, **86**:609–615.
- [9] Cheng CW, Chen CK, Chen YS, Chen LY: Determination of *Schistosoma japonicum* circulating antigens in dilution serum by piezoelectric immunosensor and S/N enhancement. *Biosensors and Bioelectronics* 2008, **24**:136–140.



## **Determination of Diluted Ethyl Alcohol in Liquid Solutions by Gas Chromatography with Internal Standard Calibration**

Liang-Yu Chen\*, Avon Chen, Linda Yi-Lin Chen, Jenny Pin-Chia Hsu

Biological system engineering laboratory, Department of Biotechnology,  
Ming-Chuan University, 333 Taoyuan, Taiwan

(Received 30 June 2009/Returned for modification 1 July 2009/Accepted 9 July 2009)

### **Abstract**

The alcoholic fermentation is the oldest and the largest biotechnology industries for current human society. Alcohol use also was related to our lives, and how to evaluate the standard levels in fermentation process and products, the determination of ethanol is a very important issue. In this study, the gas chromatography with the internal standard calibration was used to detect the alcohol concentration in liquid samples. An analytical method with rapid detection (10 minutes per each sample), high precision ( $\pm 0.3\%$ ) and broad detectable concentration range (99.5% ~ 0.05%) was established. Each of processes in this method was enhanced and verified. Further, our study could provide a good practical example for students to understand the qualitative and quantitative techniques in biochemical analysis.

**Keywords:** alcoholic analysis; ethanol; iso-propanol; GC; internal standard calibration.