

化合物別同位素比質譜術的研發進展 — 酒品摻假鑑定

Progress in Compound-Specific Isotopic Ratio Mass Spectrometry Development: Forensic Identification of Adulterated Wines

凌永健、袁玉潔、蔡沛宜、邵震茹

Yong-Chien Ling, Yu-Jie Yuan, Pei-Yi Tsai, Jenn-Ru Shao

本文利用自然界中物質組成之同位素比會受原料、製程和環境影響而有所不同，以碳同位素比為例，植物依照光合作用途徑：碳三途徑、碳四途徑與景天酸代謝，分類成 C_3 、 C_4 、和 CAM 植物，合成出不同的碳同位素比醣類，發酵製得的酒精之碳同位素比也因此不同。本研究開發利用氣相層析同位素比質譜儀進行化合物別同位素分析，以鑑定酒類摻假的方法，應用到 100 種酒品之摻假鑑定。結果證實利用有機化合物之組成元素的同位素比特異性，得以區別相同分子組成之有機化合物，化合物別同位素分析法可以彌補目前以分子組成為分析基礎之氣相層析質譜法之不足。

This research exploits that the isotopic ratio of natural materials is different dictated by their effects by feed, process, and environment. Plants are classified into C_3 , C_4 , and CAM plant depending on their photosynthetic pathway. Plant sugars thus possessing different carbon isotopic ratio. Alcohols fragmented from sugars also possess different carbon isotopic ratio. Based on this principle, we have developed a compound specific isotope analysis (CSIA) method using gas chromatograph-isotope ratio mass spectrometer (GC-IRMS) for forensic identification of adulterated wines and applied to 100 brands of wine. Our results demonstrate that by exploiting the unique isotopic property of composing elements it is possible to differentiate organic compounds with similar molecular composition. The CSIA method could compensate the deficiency of molecular-composition base gas chromatograph mass spectrometry.

一、前言

元素由單一種原子組成，原子中具有相同的質子數，在週期表中的位置相同，若中子數不同，則

稱為同位素。同位素的化學性質幾乎相同，但由於原子質量不同，其物理性質如揮發性、放射性等有所差異。自然界中多數元素大多存在一定比例之同位素，氫 (H)、碳 (C)、氮 (N)、氧 (O) 及硫 (S) 的

同位素，如 ^1H 、 ^2H 、 ^{12}C 、 ^{13}C 、 ^{14}N 、 ^{15}N 、 ^{16}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{32}S 、 ^{33}S 、 ^{34}S 及 ^{36}S 為天然穩定同位素，原子序小於 20，其同位素一般稱為輕穩定同位素。穩定同位素比例改變之主要原因來自同位素分餾作用 (isotope fractionation)，即物理、化學或生物作用發生時造成某一元素的同位素在兩種物質或兩相間分配上的差異，若因此導致較重之同位素濃度增加，稱為富集 (enrichment)；反之，若較重之同位素濃度減少，稱為耗乏 (depletion)。

同位素分餾作用主要由兩種機制所造成：同位素熱力學效應 (thermodynamic isotope effect) 及同位素動力學效應 (kinetic isotope effect)。前者為不同化合物之間、不同相之間或單分子之間，發生同位素分配變化的可逆反應，反應前後的分子數、化學組分不變，只是同位素濃度在分子組成間重新分配。後者為較重之同位素及較輕之同位素的鍵強度不同之故，反應過程中牽涉到不同同位素、不同的鍵強度導致不同的反應速率，較輕之同位素的活性較高，產物中的相對濃度因此較高；氫和氧之相對質量差異最大，為同位素分離效應最明顯的元素^(1,2)。

自然界中物質是由原子和分子所組成，組成中同位素比會受原料、製程和環境影響而有所不同，以碳同位素比為例，如圖 1⁽³⁾ 所示，植物依照光合作用途徑的不同，如：碳三途徑 (C3 pathway)、碳四途徑 (C4 pathway) 與景天酸代謝 (carassulacean

acid metabolism, CAM)，分類成 C3 (碳三)、C4 (碳四) 及 CAM (景天酸代謝) 植物，因此會合成出不同的碳同位素比醣類。常見碳三植物包括：稻米、小麥、大麥、葡萄、甜菜、芋頭與甘薯等；碳四植物包括：甘蔗、玉米、高粱與小米等；景天酸代謝植物包括：鳳梨、仙人掌與龍舌蘭等。使用不同固碳方式的植物原料製造出來的食品中，特定化合物之碳同位素比會有顯著的區別。如果汁摻糖的研究，可以利用碳三植物柳橙中果糖與碳四植物玉米製作的果糖之碳同位素比相異之現象，即化合物別同位素分析 (compound specific isotope analysis, CSIA) 原理，使用氣相層析同位素比質譜儀 (gas chromatograph-isotope ratio mass spectrometer, GC-IRMS)，鑑定柳橙汁是否被摻其他種果糖⁽⁴⁾。本研究以 GC-IRMS 分析酒中乙醇 (從糖發酵) 的碳同位素比，比對文獻中碳三、碳四及景天酸代謝植物碳同位素比^(3,5,6)，進行國內市售酒品摻假的鑑定⁽⁷⁾。

二、同位素比質譜儀

GC-IRMS 結合氣相層析儀、燃燒界面與同位素比質譜儀，利用氣相層析儀將含有多成分的待測物分離，避免層析峰重疊，再依序進入同位素比質譜儀作偵測。樣品先經由高解析氣相層析儀，依待測物與管柱靜相作用力及沸點不同而分離，接著部

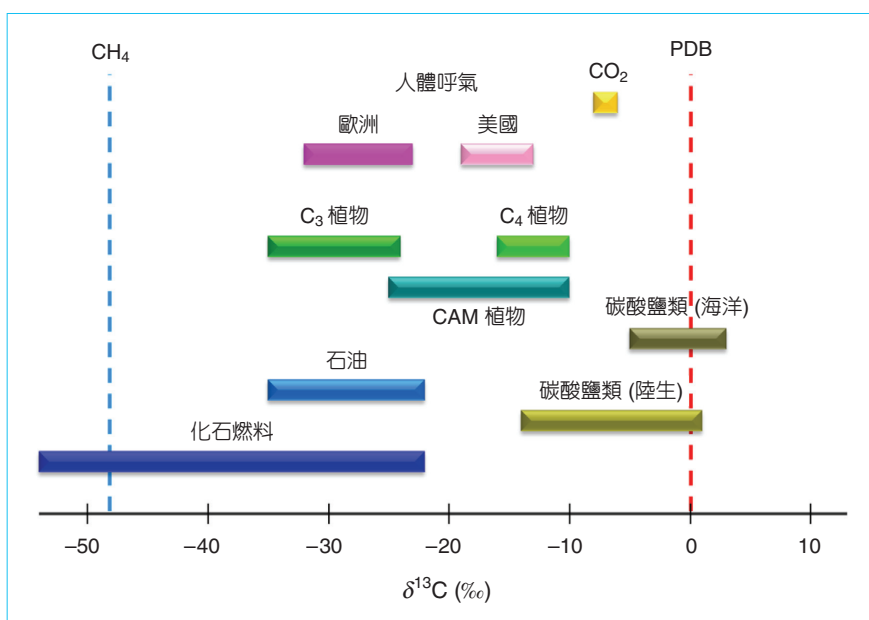


圖 1. 自然界中典型的來源物質的 $\delta^{13}\text{C}$ 值⁽³⁾ (註：PDB (PeeDee Belemnite) 為碳同位素比分析的國際標準品，為美國南卡羅萊納白堊紀 PeeDee 地層中的碳酸鹽箭石化石)。

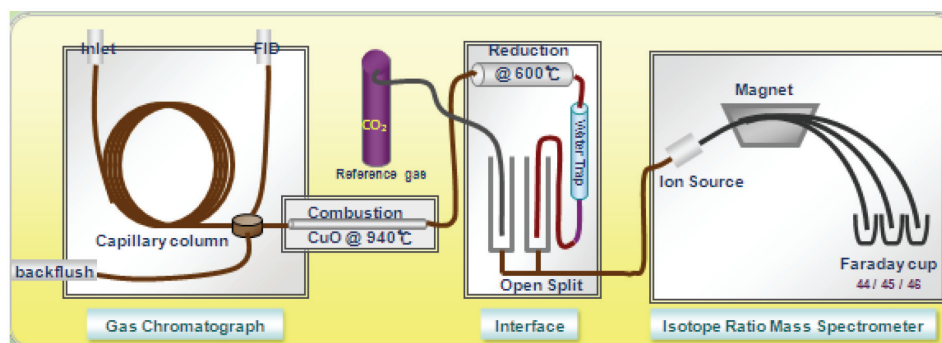
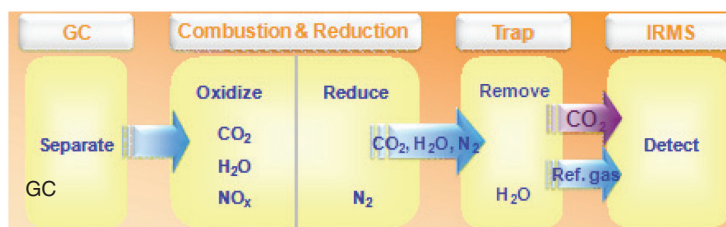


圖 2. 氣相層析同位素比質譜儀之儀器構造示意圖。

分樣品進入火焰離子化偵測器 (FID)，可以監測分離結果，利用滯留時間進行定性分析，另一部分樣品則經過燃燒界面，將所有待測物轉換成單一氣體，再依序經過氧化反應器、還原反應器、除水裝置、液態氮裝置 (氮同位素分析用)、開放分流，最後進入同位素比質譜儀。

氧化反應器由陶瓷管、CuO/NiO/Pt 組成，在 940 °C 下將待測物氧化成 CO₂、NO_x 與 H₂O；還原反應器則由銅線組成，在 600 °C 下將 NO_x 還原成 N₂；除水裝置為半滲透膜組成的納菲薄膜 (Nafion) 管，水分會穿透過膜而被移除，待測物氣體則順利通過，可以避免殘留水分與 CO₂ 反應生成 HCO₂⁺，產生同重干擾 (isobaric interference)。待測物氣體進入同位素比質譜儀後，經由電子游離法將待測物氣體游離帶電，再經過單聚焦扇形磁場 (magnetic sector field) 將不同質荷比的 CO₂⁺ 分散，以三個並排的法拉第杯 (Faraday cup) 同時偵測質荷比 44、45、46 (碳同位素分析，分別代表著 ¹²C¹⁶O₂、¹³C¹⁶O₂、¹²C¹⁸O¹⁶O 為主的氣體離子) 或質荷比 28、29、30 (氮同位素分析，分別代表著 ¹⁴N₂、¹⁴N¹⁵N、¹⁵N₂ 為主的氣體離子) 的離子電流，透過不同的電阻放大，得到其電壓值，經由演算法處理此三種質荷比對於 ¹³C 與 ¹²C 的貢獻，計算出 ¹³C 與 ¹²C 的比值，比較其與參考氣體之間的差異，以 δ¹³C 表示。單位為 ‰ (千分之一)。參考氣體會

在待測物氣體進入同位素比值譜儀前，直接進入同位素比值譜儀，被分析其 ¹³C 與 ¹²C 的比值。氣相層析同位素比質譜儀之儀器構造示意圖如圖 2 所示。

三、假酒分類

酒類異於一般飲料，在於含有食用酒精，即以糧穀、薯類、甜菜或糖蜜等為原料，經發酵、蒸餾製成含酒精成分超過 90% (v/v)。台灣加入世界貿易組織後，政府開放民間製酒。由於菸酒稅額高，酒品價格高昂。許多不肖業者使用不需課稅的變性酒精或工業用酒精當作假酒原料，製造酒品販賣以謀取暴利；或使用課稅較低的食用酒精為主要原料，添加香料再製成酒品販售以降低成本。假酒因製造原料與造假方式不同，大致上可分為 4 種：(1) 假冒酒：使用食用酒精為製酒原料，稀釋後製成酒品販賣，包裝瓶上標示的商標及成分與瓶內酒品不符。例如：外包裝為米酒，但卻是用水與糖蜜釀製的食用酒精混合製成，完全不含米釀製的酒精。(2) 侵權酒：偽造知名品牌的商標與酒瓶，將一般酒品裝入偽造的包裝後銷售。例如：偽造金門酒廠所出產的高粱酒瓶與商標，裝入私家釀造之高粱酒後販售。(3) 調製酒：使用食用酒精為主要原料，稀釋後再添加香料，以提升酒品之品嚐風味，製成酒品販售。酒品所呈現的香氣來自化學香料，

非天然原料所產生。(4) 毒酒：使用工業用酒精或變性酒精，經還原蒸餾後，製成酒品販售。因假酒製造工廠大多設備簡陋，且還原技術不佳，酒品中易殘留有害溶劑，消費者不慎飲用將危害身體健康。毒酒危害健康，嚴重者會致死，絕對不能喝，其他假酒成分與標示不符，為欺騙消費者的行為。以 GC-IRMS 分析酒中乙醇的碳同位素比，依釀酒原料植物的固碳方式不同，可分成碳三、碳四與景天酸代謝植物，利用碳同位素比結果可區分其原料與製程，用以鑑定假冒酒及侵權酒。

四、實驗步驟

本研究以 GC-IRMS 分析 100 件酒品中 (包括政府機關查扣樣品 59 件與市面購入樣品 41 件，查扣樣品種類包含米酒類、威士忌、高粱酒、芋酒、葡萄酒與工業用酒精；購入樣品包含米酒類、純麥威士忌、高粱酒、芋酒、葡萄酒、小米酒與龍舌蘭酒等) 乙醇的碳同位素比，鑑定酒品是否摻假。樣品運送回實驗室後，各樣品取出適量於 40 mL 樣品瓶中，以 4 °C 冷藏保存。分析時，各取 1 mL 所需樣品置入 2 mL 樣品瓶中，於室溫下 (25 °C) 平衡 15 分鐘後再以氣密針吸取頂空氣體注入 GC-IRMS，先以 FID 進行定性分析，將乙醇訊號分離並判別出，再以 IRMS 進行碳同位素比分析。每次分析前須先進行儀器的穩定度測試，通過後才能開始分析。且每批次樣品分析前，須以品管樣品分析

三次，確認儀器同位素比分析的精密度與準確度落於品管範圍內，才開始進行分析。每分析兩件樣品中間需穿插分析品管樣品，每批樣品分析最後時需分析一品管樣品，皆須落於品管範圍內。

五、結果與討論

1. 品保/品管

配製 20% 乙醇標準溶液，酒樣中乙醇待測物須落在標準溶液滯留時間的 3 倍標準偏差內，連續注入 7 次的 CO₂ 標準氣體，標準偏差需小於 0.07‰，以確定儀器的穩定度後，連續注入 218 ppm 的 C-13、C-14 與 C-15 烷類品管樣品 3 次，碳同位素比分析的標準偏差 (精密度) 需小於 0.3‰，注入 200 ppm 的 C-17、C-19、C-21、C-23 及 C-25 烷類品管樣品，測值與標準值相差須小於 0.2‰，方通過準確度。通過後才開始分析真實樣品，每分析兩件樣品中間須穿插分析 200 ppm 的 C-17、C-19、C-21、C-23 及 C-25 烷類品管樣品，測值與標準值相差須小於 0.3‰。

2. 穀物與水果酒品之 $\delta^{13}\text{C}$

彙整 14 件市面購入穀物與水果酒品的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布圖 (圖 3)。依原料植物之固碳方式不同，分成 C3、C4 與 CAM 植物，表 1 詳列個別樣品之植物原料、樣品編號、酒品名稱及組成標示。參考文獻中^(3,5,6)報導 C3、C4 與 CAM 植物 $\delta^{13}\text{C}$ ：C3 植物

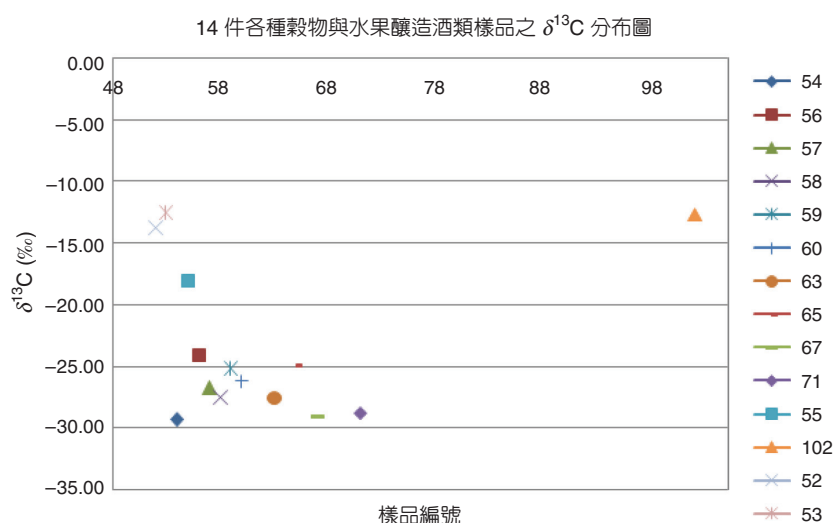


圖 3. 14 件各種穀物與水果釀造酒類樣品的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布圖。

-21‰-34‰；C4 植物 -9‰-20‰；CAM 植物 -34‰-13‰^{14,44,45}，表 1 中 14 件穀物與水果釀造酒品之 $\delta^{13}\text{C}$ 符合文獻碳同位素比分布範圍，沒有摻假現象。

3. (稻) 米類酒品之 $\delta^{13}\text{C}$

彙整 37 件政府查扣米酒類樣品、3 件政府查扣工業用酒精樣品、1 件實驗用乙醇樣品、19 件市面購入米酒類樣品，共 60 件 (稻) 米類酒類樣品的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布圖 (圖 4)。利用 3 件工業用酒精樣品 (編號 37、編號 38 與編號 41)、1 件實驗室用乙醇樣品 (編號 103)、1 件公賣局販售之紅標米酒 (編號 72)、1 件日本生產之特別純米酒 (編號 71) 作為指標性樣品，其中工業用酒精與實驗用酒精為從石油裂解得到乙炔，再經水合製備得到⁽⁹⁾，工業用酒精與實驗用酒精之 $\delta^{13}\text{C}$ 為 -12.72‰-13.72‰；公賣局可能因成本與品嚐風味考慮，紅標米酒並非全部由純米釀造酒精製成，而是由米釀酒精與糖蜜釀製的食用酒精依比例調製而成，紅標米酒之 $\delta^{13}\text{C}$ 為 -23.97‰；日本生產之特別純米酒為純米釀造酒精製成，特別純米酒之 $\delta^{13}\text{C}$ 為 -28.82‰。稻米屬於 C3 植物，其 $\delta^{13}\text{C}$ 為 -21‰-34‰^(14,44,45)，紅標米酒與特別純米酒之 $\delta^{13}\text{C}$ 皆落於此範圍內。比對其他 54 件政府查扣與市面購入之米酒樣品，相較於指標性樣品的 $\delta^{13}\text{C}$ 。44 件米酒樣品之 $\delta^{13}\text{C}$ 大於可信的紅標米酒。綜合指標性米酒樣品與文獻中 C3 植物 $\delta^{13}\text{C}$ 分

表 1.14 件市面購入穀物與水果釀造酒品資料。

植物原料	樣品編號	酒品名稱	組成標示
C3	54	紹興酒	糯米、蓬萊米與小麥
	56	芋酒	芋頭
	57	純麥威士忌	大麥
	58	純麥威士忌	大麥
	59	燒酎	大麥
	60	白葡萄酒	白葡萄
	63	紅葡萄酒	紅葡萄
	65	紅葡萄酒	紅葡萄
	67	紅葡萄酒	紅葡萄
	71	特別純米酒	稻米
C4	55	小米酒	小米
	102	二鍋頭	高粱
CAM	52	龍舌蘭酒	龍舌蘭草
	53	高粱酒	高粱與小麥

布範圍，判定 (稻) 米類酒品 $\delta^{13}\text{C}$ 大於 -20‰ 者為有摻假，分析 54 件米酒類樣品之 $\delta^{13}\text{C}$ 結果，顯示 (稻) 米類酒品摻假件數有 44 件，比例高達 79%。

4. 高粱酒品之 $\delta^{13}\text{C}$

彙整 7 件政府查扣高粱酒樣品、5 件市面購入高粱酒樣品，共 12 件高粱酒類樣品的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布圖 (圖 5)。利用 1 件市面購入二鍋頭 (編號 102) 與 1 件金門酒廠販售高粱酒 (編號 53) 作為指標性樣品，二鍋頭為純高粱釀造酒精製成， $\delta^{13}\text{C}$ 為 -12.72‰；高

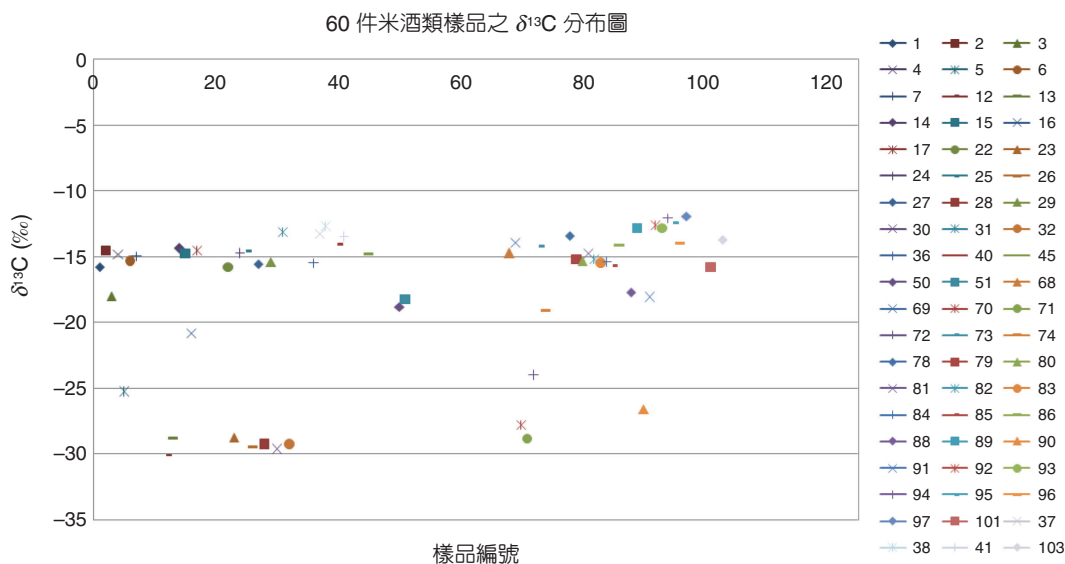


圖 4. 60 件米酒類樣品的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布圖。

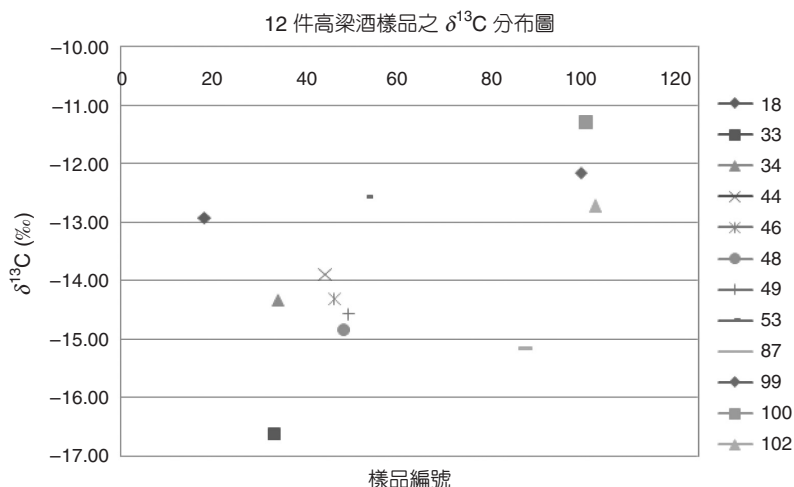


圖 5. 12 件高粱酒樣品的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布圖。

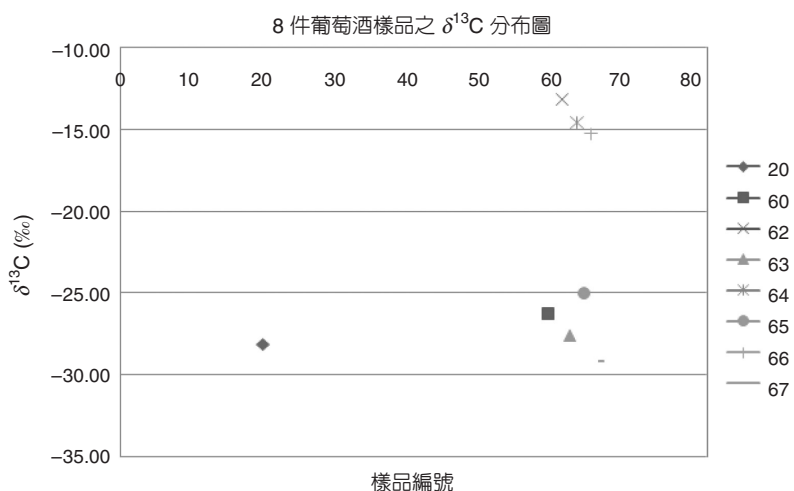


圖 6. 8 件葡萄酒樣品的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布圖。

高粱酒為高粱與小麥釀造酒精混合製成， $\delta^{13}\text{C}$ 為 -12.56‰ 。小麥屬於 C3 植物，但高粱屬於 C4 植物，C4 植物之 $\delta^{13}\text{C}$ 範圍為 $-9\text{‰} - -20\text{‰}$ ^(3,5,6)，此 2 件指標性樣品之 $\delta^{13}\text{C}$ 皆落於此範圍內。比對其他 7 件政府查扣高粱酒樣品與 3 件市面購入高粱酒樣品，相較於指標性樣品的 $\delta^{13}\text{C}$ ，所有高粱酒樣品之 $\delta^{13}\text{C}$ 皆落於 C4 植物範圍內，且非食用酒精（工業用酒精與實驗用酒精）之 $\delta^{13}\text{C}$ 為 $-12.72\text{‰} - -13.72\text{‰}$ ，與指標性高粱酒樣品之 $\delta^{13}\text{C}$ 分布範圍幾乎重疊，因此無法確定高粱酒品是否有摻雜非食用酒精。須藉助頂空氣相層析質譜儀（head space-gas chromatograph/mass spectrometer, HS-GC/MS）分析酒品中有害溶劑之殘留與揮發性香氣成分，以幫助鑑定高粱酒品是否摻假。

5. 葡萄酒品之 $\delta^{13}\text{C}$

彙整 1 件政府查扣葡萄酒樣品、7 件市面購入葡萄酒樣品，共 8 件葡萄酒類樣品的 $\delta^{13}\text{C}$ 分布圖（圖 6）。利用 1 件市面購入白葡萄酒（編號 60）與 2 件市面購入紅葡萄酒（編號 63 與編號 65）作為指標性樣品。白葡萄酒 $\delta^{13}\text{C}$ 為 -26.23‰ ，2 件紅葡萄酒之 $\delta^{13}\text{C}$ 為 $-25.01\text{‰} - -27.59\text{‰}$ 。葡萄屬於 C3 植物，C3 植物之 $\delta^{13}\text{C}$ 為 $-21\text{‰} - -34\text{‰}$ ^(3,5,6)，此 3 件指標性樣品之 $\delta^{13}\text{C}$ 皆落於此範圍內。比對其他 1 件政府查扣葡萄酒樣品與 4 件市面購入葡萄酒樣品之分析結果，相較於指標性樣品的 $\delta^{13}\text{C}$ ，發現編號 62、編號 64 與編號 66 之 $\delta^{13}\text{C}$ 皆大於 C3 植物範圍，判斷此 3 件葡萄酒樣品之酒精來源非全部由純葡萄釀造之酒精製成，應有摻雜食用酒精或非食

用酒精 (如工業用酒精) 導致碳同位素比偏正, 顯示葡萄類酒品摻假比例 38%。

六、結論

本文簡介氣相層析同位素比質譜儀 (GC-IRMS) 之儀器原理, 應用植物依照光合作用途徑不同, 分成碳三、碳四及景天酸代謝植物, 合成不同碳同位素比的醣類, 發酵製得酒精的碳同位素比也因此不同之原理。使用氣相層析同位素比質譜儀, 開發出化合物別同位素分析法, 鑑定酒品的摻假, 應用到 100 種酒品之摻假鑑定, 14 件穀物與水果酒類樣品未見摻假, 56 件米酒類樣品摻假比例高達 79%, 無法鑑定高粱酒品之摻假 (因高粱酒樣品與 C4 植物之 $\delta^{13}\text{C}$ 幾乎重疊), 8 件葡萄酒類樣品摻假比例 38%。利用有機化合物組成元素的同位素比特異性, 得以區別相同分子組成之有機化合物, 證實化合物別同位素分析法可以彌補目前以分子組成為分析基礎之氣相層析質譜法的不足。本文受限於篇幅, 僅介紹應用在酒類樣品的摻假研究, 其他研究範疇, 如食品科學、禁用藥物、環境科學與生物降解等, 仍有寬廣之研究及應用潛能, 有待感興趣之學者專家共同努力推廣。

誌謝

感謝國立清華大學及國科會經費贊助 (NSC 98-2113-M-007-016-MY3)。

參考文獻

1. 凌永健, 徐明聖, 邵震茹, 殷裕勝, 楊家懿, *科儀新知*, **153**, 70 (2006).
2. S. Benson, C. Lennard, P. Maynard, and C. Roux, *Forensic Science International*, **157**, 1 (2006).
3. W. Meier-Augenstein, *Journal of Chromatography A*, **842**, 351 (1999).
4. S. D. Kelly, C. Rhodes, J. H. Lofthouse, D. Anderson, C. E. Burswood, M. J. Dennis, and P. Brereton, *Journal of*

Agriculture and Food Chemistry, **51**, 1801 (2003).

5. G. J. Padovan, D. De Jong, L. P. Rodrigues, and J. S. Marchini, *Food Chemistry*, **82**, 633 (2003).
6. M. M. Bender, *Phytochemistry*, **10**, 1239 (1971).
7. 袁玉潔, 氣相層析同位素比質譜儀及頂空氣相層析質譜儀鑑定酒類摻假之研究, 國立清華大學化學系碩士論文 (2009).
8. 陳敏, 王世平, 食品摻偽檢驗技術, 化學工業出版社, 223 (2006).
9. D. D. Eley, H. Pines, and B. P. Weisz, *Advances in Catalysis*, **31** (1992).



凌永健先生為美國佛羅里達州立大學化學博士, 現任國立清華大學化學系教授。

Yong-Chien Ling received his Ph.D. in chemistry from the Florida State University, USA. He is currently a professor in the Department of Chemistry at National Tsing Hua University.



袁玉潔小姐為國立清華大學化學碩士。
Yu-Jie Yuan received her M.S. in chemistry from National Tsing Hua University.



蔡沛宜小姐為國立清華大學化學碩士。
Pei-Yi Tsai received her M.S. in chemistry from National Tsing Hua University.



邵震茹小姐為國立清華大學化學博士, 現任國立清華大學化學系博士後研究員。

Jenn-Ru Shao received her Ph.D. in chemistry from National Tsing Hua University. She is currently a postdoctoral research associate in the Department of Chemistry at the National Tsing Hua University.