

การหาปริมาณเอทานอลในเครื่องต้มแอลกอฮอล์ จากค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายและเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี

กรรณกนก อายุสุข¹ สุพัตรา จิมอาษา² และ คณิต กฤษณ์งูร³
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ท่าข้าม บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

บทคัดย่อ

ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลาย (K) ระหว่างวัฏภาคของเหลวและวัฏภาคแก๊สของเอทานอลในสารละลายเอทานอลมาตรฐานหาได้ง่าย โดยการเตรียมสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นเท่ากันบรรจุใน vial ขนาดเดียวกัน 2 vial ด้วยปริมาตรที่แตกต่างกัน เก็บตัวอย่างในเฮตสเปิลไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีแล้วแก้สมการทางคณิตศาสตร์ ค่า K ของสารละลายเอทานอลบริสุทธิ์ซึ่งปล่อยให้เกิดภาวะสมดุลที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ภายใต้ความดันบรรยากาศมีค่าเท่ากับ 3.013

เมื่อนำค่า K ที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในเครื่องต้มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ 25 ชนิด โดยไม่ต้องใช้วิธีการเทียบมาตรฐานภายในหรือภายนอก พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับที่ระบุไว้บนฉลาก ในการทดลองนี้พบว่าน้ำตาลซูโครสปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายเอทานอลไม่มีผลต่อค่า K ความเข้มข้นสูงสุดของเอทานอลที่ให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นเมื่อฉีดเข้าไปในเครื่อง GC ซึ่งตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด FID เท่ากับ 12 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ดังนั้นวิธีที่นำเสนอนี้จึงเป็นวิธีที่ง่าย มีความถูกต้องและเชื่อถือได้

คำสำคัญ : แก๊สโครมาโตกราฟี / ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลาย / เครื่องต้มแอลกอฮอล์ / เทคนิคเฮตสเปิล / เอทานอล

¹ อาจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

² นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

³ รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

Determination of Ethanol Content in Alcoholic Beverages by Using Partition Coefficient and Gas Chromatographic Technique

Kornkanok Aryusuk ¹, Supattra Jim-arsa ², and Kanit Krisnangkura ³

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thakham, Bangkhuntian, Bangkok 10150

Abstract

The partition coefficient (K) between liquid-gas phases of ethanol could be easily obtained by preparation of two identical vials filled with ethanolic solutions of different volumes. The headspace samples were collected and injected into a gas chromatograph. The K obtained by solving two mathematic equations for pure ethanolic solution equilibrated at 50 °C for 30 minutes was 3.013.

The obtained K value was then used to determine ethanol concentration in 25 brands of alcoholic beverages. Without requiring any internal or external standardization, it was found that the concentration of ethanol was approximately the same as they were labeled on the bottles. In this study, sucrose (2 %w/v) in the ethanolic solution did not affect the K value. The maximum concentration of ethanol injected into a GC equipped with FID detector was still linear at 12 %(v/v). Thus, it was concluded that the proposed method was simple and accurate.

Keywords : Alcoholic Beverage / Ethanol / Gas Chromatography / Headspace Technique / Partition Coefficient

¹ Lecturer, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

² Graduated Student, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

³ Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

1. บทนำ

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มีด้วยกันหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีจำเป็นต้องสกัดเอทานอลออกจากตัวอย่างก่อน เช่นการสกัดตัวอย่างโดยการกลั่น (distillation) [1] การสกัดด้วยตัวทำละลาย [2] หรือ pervaporation [3] ร่วมกับระบบการฉีดสารแบบ flow injection เพื่อนำส่วนที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณต่อด้วยเทคนิคต่างๆ ทั้งการวัดทางกายภาพ (physical measurement) โดยใช้ไฮโดรมิเตอร์ (hydrometer) การวัดโดยสเปกโตรสโกปีที่มีความยาวคลื่นช่วงอินฟราเรดหรือใกล้อินฟราเรด (infrared or near infrared spectroscopy) [4, 5] การวัดทางโครมาโตกราฟี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ที่ต่อพ่วงกับเครื่องตรวจวัดชนิดเฟลมไอออไนเซชัน (gas chromatography with flame ionization detector; GC-FID) [6, 7]

การวิเคราะห์สารด้วย GC ได้รับความนิยมสูงเนื่องจากสามารถวิเคราะห์สารได้อย่างแม่นยำ ภายในเวลาอันรวดเร็วโดยใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อย การวิเคราะห์ด้วย GC ที่ใช้คอลัมน์แบบแพค เป็นวิธีมาตรฐานวิธีหนึ่งซึ่ง AOAC กำหนดให้ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ [8] ซึ่ง Wang และคณะ [7] ได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเมทานอลและเอทานอลในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ด้วย GC ที่ใช้สาร 2 ชนิดคือ 2-pentanol และ acetonitrile เป็นสารมาตรฐานภายใน โดยการฉีดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางเข้าแคพิลลารีคอลัมน์ขนาดใหญ่ (mega-pore capillary column; CP-Wax 58 CB) โดยตรงแล้วตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัด FID ซึ่งวิธีนี้ทำให้สามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 12 นาที

อย่างไรก็ตามการตรวจวัดสารด้วย GC มีข้อจำกัดคือสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ต้องสะอาดและสามารถระเหยกลายเป็นไอ หรือเปลี่ยนให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ที่ระเหยกลายเป็นไอได้ทั้งหมดไม่เช่นนั้นจะก่อให้เกิดการสะสมของสิ่งเจือปน และสารที่ไม่ระเหยอยู่ภายในบริเวณฉีดสาร (injector) และส่วนต้นของคอลัมน์ทำให้คอลัมน์เสื่อมได้ง่ายและอาจส่งผลให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้ ดังนั้นการเตรียมสารตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วย GC โดยเฉพาะสารที่ต้องการวิเคราะห์ซึ่งมีปริมาณต่ำ หรือสารตัวอย่างจากธรรมชาติที่มีองค์ประกอบซับซ้อน เช่นสารให้กลิ่น (flavor) จากดอกไม้ ผลไม้ การตรวจสอบสารให้กลิ่นในอาหาร หรือสารบางชนิดที่สามารถบ่งชี้ถึงการเน่าเสียของอาหาร [9-13] จึงนิยมใช้เทคนิคการเตรียมสารที่เรียกว่าเฮดสเปซ (headspace (HS) sampling technique) ซึ่งเป็นการสกัดสารในวัฏภาคแก๊ส (vapor phase extraction) ที่เกิดจากการแบ่งละลาย (partitioning) ระหว่างวัฏภาคของเหลวหรือของแข็งที่ไม่ระเหย (non-volatile liquid or solid phase) กับวัฏภาคแก๊ส (vapor phase) เหนือของเหลวหรือของแข็งนั้น การเก็บตัวอย่างสารด้วยเทคนิคนี้มีทั้งแบบ static- และ dynamic HS เทคนิคที่เรียกว่า solid phase microextraction (SPME) รวมทั้งเทคนิคอื่นๆ [14] เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย GC

การแบ่งละลายของสารชนิดใดชนิดหนึ่งที่ภาวะสมดุล (equilibrium state) ระหว่าง 2 วัฏภาคจะมีค่าคงที่เสมอที่ภาวะความดันและอุณหภูมิจำเพาะหนึ่ง ซึ่งสามารถบอกได้ด้วยค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลาย (partition coefficient; K) โดยค่า K ถือเป็นค่าเฉพาะตัวที่แสดงคุณสมบัติของสารนั้นๆ ได้มีการนำค่า K มาใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่นการสกัดสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางยาออกจากตัวอย่างทั้งที่เป็นของแข็งหรือของเหลวด้วยตัวทำละลาย Katritzky และคณะ [15] ได้นำค่า K ของสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ในยารักษาโรคหรือในเลือด มาใช้อธิบายลักษณะทางเภสัชจลศาสตร์ของยาเมื่อเข้าสู่ร่างกาย โดยใช้เอทานอลเป็นตัวแทนเพื่อศึกษาความสามารถในการ

ละลายของสารประกอบอินทรีย์ในของเหลวที่เป็นกลาง หรือการใช้ประโยชน์ของค่า K มาโยงความสัมพันธ์กับตัวแปรอื่นๆ ได้แก่แก๊สอุณหภูมิจำนวนคาร์บอนของสาร [16] เพื่อสร้างสมการที่นำมาใช้ในการทำนายการเคลื่อนที่ของสารใน GC โดยไม่ต้องใช้สารอ้างอิงเป็นต้น

การหาค่า K โดยอาศัยหลักของเฮดสเปซ สามารถทำได้ทั้งในระบบ static- และ dynamic HS-GC แต่ในทางปฏิบัติระบบ static จะให้ความสะดวกกว่ามากเนื่องจากสามารถควบคุมปัจจัยของอุณหภูมิโดยการควบคุมอุปกรณ์คืออ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เพียงอย่างเดียวเท่านั้นเพื่อให้สารเข้าสู่ภาวะสมดุล ในขณะที่ระบบ dynamic จำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิของแก๊สตัวพาด้วย อย่างไรก็ตามการหาค่า K ของสารจำเป็นต้องตรวจวัดความเข้มข้นของสารในแต่ละวัฏภาคที่จุดสมดุล ซึ่งวิธีการและขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยาก โดยเฉพาะการตรวจวัดปริมาณสารในตัวอย่างของเหลวที่มีองค์ประกอบซับซ้อน [17] วิธีที่ง่ายขึ้นคือการนำส่วนแก๊สของสารมาตรฐานภายนอกมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารในวัฏภาคแก๊ส ส่วนความเข้มข้นของสารในตัวอย่างหาได้จากความแตกต่างของปริมาณทั้งหมดในภาชนะปิดขนาดเล็ก (vial) อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้จำเป็นต้องทราบความเข้มข้นเริ่มต้นของสารในตัวอย่าง [18] การหาค่า K ซึ่งเสนอโดย Ettre และคณะ [19, 20] ที่เรียกว่า phase ratio variation method (PRV) โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่าง K ที่ได้จากการวัดพื้นที่ใต้พีคของ GC (peak area) กับอัตราส่วนวัฏภาค (phase ratio) ของสารที่บรรจุอยู่ใน vial มีข้อดีคือไม่ต้องใช้สารมาตรฐานทั้งภายในและภายนอกในการตรวจวัดปริมาณสาร แต่จำเป็นต้องตรวจวัดสารที่มีอัตราส่วนวัฏภาคต่างๆ กันอย่างน้อย 4 ค่าเพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน [21, 22] ซึ่ง Chai และ Zhu [23] ได้พัฒนาหลักการนี้ในการศึกษาค่าสมดุลของสารระหว่างวัฏภาคแก๊ส-ของเหลว (vapor-liquid phase equilibrium) โดยวิเคราะห์ตัวอย่างซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากันบรรจุใน vial ที่ปริมาตรต่างกัน แล้วคำนวณค่า K โดยการแก้สมการทางคณิตศาสตร์

ถึงแม้ว่าปัจจุบันนี้การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในเครื่องดื่มตามท้องตลาดจะมีวิธีอื่นๆ ที่สะดวกรวดเร็วราคาไม่แพงและไม่ต้องการความแม่นยำสูงมากนัก แต่การใช้ GC ในการวิเคราะห์ก็ยังมีประโยชน์ทาง Forensic เพื่อหาปริมาณเอทานอลในตัวอย่างชีวภาพ (biological sample) เช่นในเลือดหรือปัสสาวะ เป็นต้น นอกจากนี้แนวความคิดเริ่มต้นของงานวิจัยนี้คือเพื่อต้องการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลาย (K) ร่วมกับการใช้ GC มาติดตามปริมาณเอทานอลในถังหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และยังอาจนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพของการผลิตเครื่องดื่มชนิดนี้ได้

ในรายงานวิจัยฉบับนี้ จึงนำเสนอวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลขั้นต้นในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี ซึ่งมีการเตรียมสารตัวอย่างโดยอาศัยหลักการแบ่งละลายหรือค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลาย (K) ของเอทานอลระหว่างวัฏภาคของน้ำและวัฏภาคของแก๊สในระบบ static headspace โดยไม่อาศัยสารอ้างอิงแต่จะใช้วิธีแก้สมการทางคณิตศาสตร์เพื่อวิเคราะห์หาค่า K แล้วนำไปหาความเข้มข้นของเอทานอลในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ รวมทั้งศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อค่า K ของเอทานอลในสารละลายตัวอย่าง

2. ทฤษฎี

ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายของสารระหว่างวัฏภาคของเหลวและวัฏภาคแก๊สสามารถหาได้จากความสัมพันธ์ดังสมการที่ (1)

$$K = \frac{C_L}{C_G} \quad (1)$$

หรือ

$$K = \frac{M_L}{V_L} \times \frac{V_G}{M_G} \quad (2)$$

เมื่อ K คือค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายของสาร C_L , M_L และ V_L คือความเข้มข้น มวล และปริมาตรของสารในวัฏภาคของเหลว C_G , M_G และ V_G คือความเข้มข้น มวล และปริมาตรของสารในวัฏภาคแก๊ส ตามลำดับ

ในกรณีของเหลวซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากันบรรจุในภาชนะปิดขนาดเล็ก (closed vial) ด้วยปริมาตรต่างกัน สามารถแทนค่าตัวแปรในสมการที่ (2) และแก้สมการทางคณิตศาสตร์เพื่อหาปริมาณสารทั้งหมดในทั้งสองวัฏภาคได้ดังนี้คือ

เมื่อกำหนดให้

Y ปริมาณสารทั้งหมดที่มีอยู่ในทั้งสองวัฏภาคของภาชนะปิดชุดที่ 1 ซึ่งมีปริมาตรของเหลวเท่ากับ V_{L1}

X_1 ปริมาณสารในชั้นของแก๊ส (vapor phase) ในภาชนะปิดชุดที่ 1

X_2 ปริมาณสารในชั้นของแก๊สในภาชนะปิดชุดที่ 2

a อัตราส่วนระหว่างปริมาตรของเหลวในภาชนะปิดชุดที่ 2 ต่อชุดที่ 1 (V_{L2}/V_{L1})

K ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายของสาร

แทนค่าตัวแปรที่ได้จากการวัดปริมาณสารในชั้นแก๊สแต่ละครั้งลงในสมการ (2)

$$\text{การวัดปริมาณสารในชั้นแก๊สชุดที่ 1} \quad K_1 = \left(\frac{Y-X_1}{V_{L1}} \right) \cdot \left(\frac{V_{G1}}{X_1} \right) \quad (3)$$

$$\text{การวัดปริมาณสารในชั้นแก๊สชุดที่ 2} \quad K_2 = \left(\frac{aY-X_2}{V_{L2}} \right) \cdot \left(\frac{V_{G2}}{X_2} \right) \quad (4)$$

ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายของสารระหว่างสองวัฏภาคจำเพาะหนึ่งๆ ที่ภาวะความดัน และอุณหภูมิคงที่มีค่าคงที่ นั่นคือ $K_1 = K_2$ ดังนั้น

$$\left(\frac{Y-X_1}{V_{L1}} \right) \cdot \left(\frac{V_{G1}}{X_1} \right) = \left(\frac{aY-X_2}{V_{L2}} \right) \cdot \left(\frac{V_{G2}}{X_2} \right) \quad (5)$$

เนื่องจากการเก็บตัวอย่างสารในวัฏภาคแก๊สทำในภาชนะปิดที่มีปริมาตรแน่นอน และปริมาณสาร (X_1/X_2) แปรผันโดยตรงกับพื้นที่ใต้พีค (peak area; A) ที่ได้จากการวัดด้วย GC ดังนั้นจึงสามารถแทนค่า X_1 และ X_2 ด้วยค่า A_1 และ A_2 ได้โดยตรง ดังนั้น

$$\left(\frac{Y-A_1}{V_{L1}}\right) \cdot \left(\frac{V-V_{L1}}{A_1}\right) = \left(\frac{aY-A_2}{V_{L2}}\right) \cdot \left(\frac{V-V_{L2}}{A_2}\right) \quad (6)$$

ดังนั้น

$$Y = \frac{F_1 F_2 A_2 - A_1}{a - F_1 F_2 - 1} \quad (7)$$

เมื่อ F_1, F_2 คือค่าคงที่: $F_1 = \left(\frac{A_1}{A_2}\right) \cdot \left(\frac{V_{L1}}{V_{L2}}\right)$ และ $F_2 = \left(\frac{V-V_{L2}}{V-V_{L1}}\right)$

ค่า Y ที่ได้จากสมการ (7) สามารถนำไปแทนค่าลงในสมการ (3) หรือ สมการ (4) เพื่อหาค่า K ของสารต่อไป

3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 สารตัวอย่าง

เอทานอล 99.8% (ethanol; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) analytical grade จากบริษัทแล็บสแกน เอเชีย จำกัด ประเทศไทย ตัวอย่างเครื่องตีแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ หาซื้อจากท้องตลาด

3.1.2 คอลัมน์

ในการทดลองใช้แคปิลารีคอลัมน์ Supelcowax-10 ที่เคลือบด้วยวัสดุโพลีเอทิลีนไกลคอล (Poly ethylene glycol) ขนาด 30 เมตร x 0.53 มิลลิเมตร x 0.50 ไมโครเมตร จากบริษัท Supelco Co., Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3 แก๊สโครมาโตกราฟี

ใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีรุ่น Shimadzu 17A มีเครื่องตรวจวัดแบบ flame ionization detector (FID) ทั้งหมดจากบริษัทชิมาดะ ประเทศญี่ปุ่น ใช้ระบบการฉีดสารแบบไม่ปล่อยสารทิ้ง (splitless injection) โดยมีแก๊สไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพาที่อัตราการไหล 0.5-1.5 มม./นาที อุณหภูมิของส่วนฉีดสารและ เครื่องตรวจวัด 180 °ซ อุณหภูมิของคอลัมน์ 50 °ซ

3.2 การเตรียมสารตัวอย่าง

3.2.1 การเตรียมสารมาตรฐานเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลาย

เจือจางเอทานอลบริสุทธิ์ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 25 °ซ เพื่อใช้เป็นสารละลายมาตรฐาน ดูดสารละลายที่ได้ใส่ vial ขนาด 5 มล. จำนวน 2 ชุด โดยชุดแรกใส่ สารละลายปริมาตร 1 มล. และชุดที่ 2 ปริมาตร 2 มล. ปิดผนึกด้วยฝาเกลียวที่มี septum ชนิด teflon on silicone

บ่ม (incubate) vial ใน dry block heater ที่อุณหภูมิ 50 °ซ โดยมีการเขย่า vial ทุก 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ดูตัวอย่างส่วนที่เป็นแก๊สปริมาตร 1 ไมโครลิตร ด้วยเข็มฉีดยา (gas tight syringe) ฉีดเข้าเครื่อง GC

3.2.2 การเตรียมตัวอย่างเครื่องตีแอลกอฮอล์

นำตัวอย่างเครื่องตีแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 25 °ซ ดูสารละลายที่ได้ใส่ vial ขนาด 5 มล. ปริมาตร 1 มล. แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐานเอทานอล

4. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลาย (K) ของเอทานอลระหว่างวัฏภาคของเหลวและแก๊ส

ปริมาณเอทานอลทั้งหมด (Y) ในรูปของพื้นที่ใต้พีคสามารถหาได้จากสมการที่ (7) ดังแสดงผลในตารางที่ 1 เมื่อทราบปริมาณสารทั้งหมดแล้วสามารถนำไปแทนค่าลงในสมการ (3) หรือ (4) เพื่อคำนวณหาค่า K ของเอทานอล ระหว่างวัฏภาคของเหลว และแก๊สซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.013

ตารางที่ 1 แสดงพื้นที่ใต้พีคของการฉีดเอทานอลซึ่งอยู่ในวัฏภาคแก๊สชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ซึ่งมีพื้นที่เท่ากับ A_1 และ A_2 ตามลำดับ รวมทั้งปริมาณเอทานอลทั้งหมดที่คำนวณได้จากสมการ (7)

การทำซ้ำ	A_1	A_2	เอทานอลทั้งหมด (Y) คิดเป็นพื้นที่ใต้พีค
ครั้งที่ 1	1,010,716	1,176,471	1,776,084
ครั้งที่ 2	1,012,587	1,180,562	1,774,163
ครั้งที่ 3	1,015,250	1,184,285	1,777,156
ค่าเฉลี่ย	1,012,851	1,180,439	1,775,801

หมายเหตุ ปริมาตรรวม (V) 5 มล.; $V_{L1} = 1$ มล.; $V_{L2} = 2$ มล. ; และสารละลายเจือจาง 100 เท่า

ค่า K ที่ได้เป็นค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายของเอทานอลระหว่างสองวัฏภาค ณ จุดสมดุลซึ่งได้จากการเตรียมตัวอย่างปริมาตร 1-2 มล. ที่ความดันบรรยากาศ อุณหภูมิ 50 °ซ ในภาวะที่มีการเขย่า vial เป็นเวลา 30 นาที การทดลองแปรเปลี่ยนระยะเวลาในการเขย่า vial (ซึ่งไม่ได้แสดงผลการทดลองไว้ในที่นี้) พบว่ามีผลทำให้ค่า K ที่ได้เปลี่ยนแปลงไปด้วย โดยพบว่าที่เวลา มากกว่า 25 นาที ค่า K มีค่าคงที่ แสดงว่าเอทานอลได้เข้าสู่ภาวะสมดุลแล้ว ดังนั้นในที่นี้จึงเลือกเวลาที่ใช้ในการเขย่า vial เท่ากับ 30 นาที อย่างไรก็ตามหากต้องการลดระยะเวลาในการเตรียมสารลงสามารถทำได้โดยปรับเปลี่ยนภาวะที่ใช้ในการทดลอง ในงานวิจัยของ Strassnig และ Lankmayr [24] วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างแบบ static HS ในสารละลาย human albumin พบว่าภาวะสมดุลของสารตัวอย่างปริมาณ 2 มล. ที่อุณหภูมิ 60 °ซ ใช้เวลาเพียง 10 นาที เท่านั้น

4.2 การทดสอบความถูกต้องของค่า K ในสารละลายมาตรฐานเอทานอล

การทดสอบว่าค่า K ของสารละลายเอทานอลมาตรฐาน ที่หาได้จากการแก้สมการทางคณิตศาสตร์สมการ (7) มีความถูกต้องและเชื่อถือได้ ทำโดยการเก็บตัวอย่างเอทานอลในภูมิภาคแก๊สของสารละลายมาตรฐานเอทานอล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2, 3, 4 และ 5 ที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.2.1 โดยใช้ปริมาตรของสารละลาย 1 มล. นำค่า K ซึ่งได้มาจากสารละลายเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้นร้อยละ 1 นี้ไปใช้ในการหาความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่ความเข้มข้นอื่นๆ ดังตัวอย่างในสารละลายมาตรฐานเอทานอล ร้อยละ 2 ซึ่งมีพื้นที่ใต้พีค (A) เท่ากับ 2,037,644 สามารถคำนวณปริมาณเอทานอลทั้งหมดได้ดังสมการด้านล่าง และแสดงผลไว้ในตารางที่ 2

$$\text{จาก } K = \frac{M_L}{V_L} \times \frac{V_G}{M_G} = \left(\frac{Y-A}{V_L} \right) \times \left(\frac{V-V_L}{A} \right)$$

$$3.013 = \left(\frac{Y-2037644}{1} \right) \cdot \left(\frac{4}{2037644} \right)$$

ได้ปริมาณเอทานอลทั้งหมดคิดเป็นพื้นที่ใต้พีค $Y = 3,572,499$ ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นของ เอทานอลได้เท่ากับ ร้อยละ 2.01

ตารางที่ 2 ปริมาณเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งได้จากการคำนวณโดยใช้ค่า K ของเอทานอล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1

สารละลายมาตรฐานเอทานอล (%)	พื้นที่ใต้พีค (A)	ความเข้มข้นที่คำนวณได้ (%)	ผล H_2 (%)
2	2,037,644	2.012	0.012
3	3,052,959	3.014	0.014
4	4,095,287	4.043	0.043
5	5,087,583	5.023	0.023

หมายเหตุ: $K = 3.013$; พื้นที่ใต้พีคได้จากการค่าเฉลี่ยของการเก็บข้อมูล 3 ซ้ำ; ความเข้มข้นที่คำนวณได้คิดเทียบจากพื้นที่ใต้พีคซึ่งคำนวณได้จากความเข้มข้นที่ร้อยละ 1 ($Y = 1,775,801$)

จากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าค่า K ที่หาได้โดยใช้สมการที่ (2) ร่วมกับการแก้สมการทางคณิตศาสตร์สามารถนำมาใช้ในการหาปริมาณเอทานอลในสารละลายมาตรฐานอื่นๆ ซึ่งน่าจะนำไปใช้ประโยชน์ในการหาปริมาณเอทานอลในเครื่องตีมีแอลกอฮอล์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดได้

4.3 การหาปริมาณเอทานอลในเครื่องต้มแอลกอฮอล์

ได้นำตัวอย่างเครื่องต้มแอลกอฮอล์ที่ไม่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นส่วนผสมชนิดต่างๆ ซึ่งมีขายในท้องตลาดได้แก่ กลุ่มสุรากลั่น สุราผสม วิสกี้ สาโท ยิน ไวน์ และรัม มาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลที่มีในเครื่องต้มแต่ละชนิดโดยการเก็บตัวอย่างในวิญภาคแก๊สปริมาตร 1 โมโนลิตร ฉีดเข้าเครื่อง GC บันทึกผลค่าพื้นที่ใต้พีคแล้วนำไปคำนวณปริมาณเอทานอลทั้งหมดที่มีอยู่ในเครื่องต้มแต่ละชนิด เปรียบเทียบกับค่าที่รายงานไว้บนฉลาก ดังแสดงผลในตารางที่ 3

จากตารางที่ 3 ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการหาปริมาณเอทานอลในเครื่องต้มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายของเอทานอลระหว่างวิญภาคของเหลวและวิญภาคแก๊ส แล้วตรวจวัดด้วยเครื่อง GC ให้ผลการทดลองที่ถูกต้องและเชื่อถือได้ ทั้งเครื่องต้มในกลุ่มสุรากลั่น สุราผสม วิสกี้ ยิน และรัม ซึ่งให้ผลต่างของปริมาณเอทานอลจากฉลากระบุ อยู่ในช่วงร้อยละ -3 ถึง 2 แสดงว่าเครื่องต้มแอลกอฮอล์ที่มีจำหน่ายได้ควบคุมปริมาณแอลกอฮอล์อย่างเคร่งครัด เนื่องจากมีกฎหมายเกี่ยวกับระบบภาษีของการนำเข้าเครื่องต้มแอลกอฮอล์โดยคิดตามปริมาณหรือแรงแอลกอฮอล์ อย่างไรก็ตามเครื่องต้มประเภทสาโทและไวน์ผลไม้ที่ผลิตในระดับกลุ่มชาวบ้านหรือโรงงานผลิตขนาดเล็ก พบว่าปริมาณเอทานอลที่ตรวจวัดได้มีค่าสูงกว่าฉลากระบุค่อนข้างมาก คิดเทียบเป็นร้อยละความแตกต่างอยู่ในช่วงร้อยละ 6-27

4.4 การศึกษาผลกระทบของน้ำตาลที่มีต่อการวัดปริมาณเอทานอลในเครื่องต้มแอลกอฮอล์

ในเครื่องต้มแอลกอฮอล์บางกลุ่ม เช่น กลุ่มสุราผสม วิสกี้ ไวน์ผลไม้ และสาโท อาจมีน้ำตาลปริมาณเล็กน้อยเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นเพื่อตรวจสอบว่าน้ำตาลซึ่งอยู่ในเครื่องต้มเหล่านี้ มีผลต่อกระทบต่อปริมาณเอทานอลที่ตรวจวัดได้หรือไม่ จึงได้ทดลองวัดปริมาณเอทานอลในสารละลายแอลกอฮอล์มาตรฐานปกติเทียบกับสารละลายที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบร้อยละ 2 ซึ่งผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ระบุไว้บนฉลากและปริมาณที่คำนวณได้จากค่า K ในเครื่องต้มแอลกอฮอล์ 25 ชนิด (พื้นที่ใต้พีคได้จากการค่าเฉลี่ยของการเก็บข้อมูล 3 ซ้ำ)

ตัวอย่างเครื่องดื่ม	ปริมาณเอทานอล (% v/v) ที่ระบุบนฉลาก	พื้นที่ใต้พีค (A)	ปริมาณเอทานอล (% v/v) ที่คำนวณได้	ผลต่าง (%)
สุราขาว 1	28	999,016	27.72	-1.00
สุราขาว 2	30	1,017,852	30.00	0.00
สุราขาว 3	35	1,023,571	35.35	1.00
สุราขาว 4	40	1,008,758	40.00	0.00
พญาลอ	40	988,074	39.20	-2.00
Beefeater	40	1,019,554	40.40	1.00
Gilbey's	41	991,070	40.18	-2.00
แม็ซิง	35	994,816	34.30	-2.00
มังกรทอง	35	1,019,453	35.35	1.00
Crown 99	35	1,008,758	35.00	0.00
Master Blend	35	1,020,266	35.35	1.00
Black Label	40	998,804	39.60	-1.00
Red Label	40	1,012,333	40.00	0.00
Red Suntory	40	988,565	39.20	-2.00
John Master	35	1,018,633	35.35	1.00
Mc carter	30	1,013,222	30.00	0.00
Chairman's	30	1,024,916	30.30	1.00
Cavalier	38	985,019	36.86	-3.00
กูปรี	4	1,162,418	4.60	15.00
กระซู่	4	1,112,524	4.40	10.00
สาโทสยาม	8	1,069,400	8.48	6.00
Tamrab 2	12	1,283,103	15.24	27.00
Pen Flods Bin 2	14.5	1,019,548	14.65	1.00
แสงโสม	40	1,023,203	40.40	1.00
Boss	30	1,028,217	30.60	2.00

หมายเหตุ: เครื่องดื่มแอลกอฮอล์กลุ่มสุรากลั่น: สุราขาว (1, 2, 3, 4) พญาลอ; กลุ่มยีน (gin): Beefeater, Gilbey's; กลุ่มสุราผสม: แม็ซิง มังกรทอง Crown 99 Master Blend; กลุ่มวิสกี: Black Label, Red Label, Red Suntory, John master, Mc carter, Chairman's; กลุ่มสาโท: สาโทข้าวเหนียวดำ กูปรี สาโทข้าวหอมมะลิ กระซู่ สาโทสยาม; กลุ่มไวน์: ไวน์ผลไม้ tamrab 2, Pen Flods Bin 2; กลุ่มรัม (Rum): แสงโสม และ Boss

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของเอทานอลที่ได้จากการตรวจวัดสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ในน้ำ และในสารละลายน้ำตาลร้อยละ 2 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

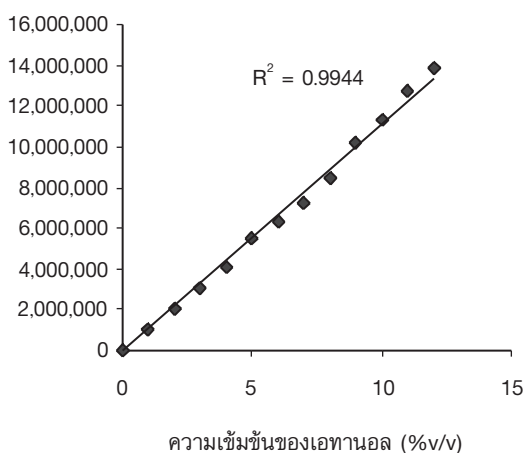
ครั้งที่	พื้นที่ใต้พีคของเอทานอล		ผลต่าง (%)
	ในน้ำ	ในสารละลายน้ำตาล	
1	1,010,716	1,011,128	-0.04
2	1,012,587	1,019,524	-0.69
3	1,015,250	1,012,465	0.27

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้จากสารละลายเอทานอลทั้ง 2 ชุด มีความแตกต่างกันน้อยมาก คือร้อยละ -0.69 ถึง 0.27 แสดงว่าค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลายของเอทานอลร้อยละ 1 ระหว่างวัฏภาคของเหลวซึ่งเป็นสารละลายน้ำตาลร้อยละ 2 และวัฏภาคแก๊ส มีค่าไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับเอทานอลที่ละลายอยู่ในน้ำ จากงานวิจัยของ Strassing และ Lankmayr [24] ซึ่งทดลองวัดปริมาณเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ร้อยละ 0.1-10 ในน้ำเทียบกับในสารละลายโปรตีน (human albumin) ร้อยละ 20 พบว่าที่ความเข้มข้นสูง ปริมาณเอทานอลที่วัดได้ในสารละลายโปรตีนจะมีปริมาณสูงกว่าปริมาณที่วัดได้ในน้ำประมาณร้อยละ 10 อย่างไรก็ตามที่ปริมาณเอทานอลต่ำค่าที่วัดได้ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นหากต้องการตรวจวัดปริมาณเอทานอลในตัวอย่างที่มีสารละลายโปรตีนร้อยละ 20 Strassing และ Lankmayr จึงแนะนำให้ใช้วิธีการระเหยตัวอย่างจนหมด แล้วเก็บส่วนที่ระเหยได้ไปวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล แต่เนื่องจากในงานวิจัยนี้น้ำตาลซึ่งเป็นสิ่งเจือปนในตัวอย่างเครื่องดื่มชนิดต่างๆ มีปริมาณน้อยประกอบกับการตรวจวัดตัวอย่างทั้งหมดได้เจือจางที่ความเข้มข้นเพียงร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) เท่านั้น จึงไม่ได้ศึกษาถึงผลกระทบของปริมาณน้ำตาลที่มีต่อความเข้มข้นของตัวอย่าง

ในที่นี้ไม่ได้พิจารณาถึงผลกระทบของสารให้กลั่นซึ่งระเหยได้ และมีเป็นองค์ประกอบในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ แต่คาดว่าสารให้กลั่นเหล่านี้ไม่น่าจะมีผลต่อค่า K ของเอทานอลในเครื่องดื่มที่ทำการวิเคราะห์ เนื่องจากมีสัดส่วนต่ำมากเมื่อเทียบกับปริมาณเอทานอล ยกเว้นเครื่องดื่มประเภทเบียร์ หรือไวน์ที่มีการอัดแก๊ส ซึ่งคาดว่าแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีเป็นส่วนประกอบในเครื่องดื่มเหล่านี้มีผลกระทบต่อปริมาณเอทานอลที่ตรวจวัดได้โดยใช้เทคนิคนี้ อย่างไรก็ตามข้อดีของการตรวจวัดปริมาณเอทานอลด้วย GC คือสีของเครื่องดื่มไม่มีผลกระทบต่อปริมาณที่วัดได้ ซึ่งแตกต่างจากการตรวจวัดด้วย spectrophotometry [2] ที่วัดปริมาณเอทานอลในเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีสีได้สูงกว่าความเป็นจริง

4.5 การศึกษาขีดความสามารถของเครื่องตรวจวัด FID ต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่วิเคราะห์ได้

เพื่อต้องการทราบข้อจำกัดถึงปริมาณสูงสุดที่สามารถตรวจวัดสารระเหยได้จากค่า K ด้วยเทคนิค HS-GC ในการทดลองนี้จึงได้เตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐานที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1-30 (ปริมาตร/ปริมาตร) ด้วยวิธีเดียวกับหัวข้อ 3.2.2 และตรวจวัดด้วย GC เมื่อนำพื้นที่ใต้พีคมาเขียนกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเอทานอลได้กราฟเส้นตรงพบว่าเครื่องตรวจวัดชนิด FID ของเครื่อง GC มีความสามารถในการตรวจวัดปริมาณเอทานอลได้จำกัดที่ความเข้มข้นระดับหนึ่งเท่านั้น (ไม่เกินร้อยละ 12) ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งมีค่าความเชื่อมั่น เท่ากับ 0.9944 ที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับปริมาณสารที่วัดได้มีค่าลดลง ดังนั้นหากต้องการวัดปริมาณเอทานอลในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นสูงเกินร้อยละ 12 จำเป็นต้องเจือจางสารให้มีความเข้มข้นไม่เกินร้อยละ 12



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ของพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล มาตรฐานที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 -12

5. สรุปผลการวิจัย

การเก็บตัวอย่างเอทานอลในวสุภาคแก๊ส (headspace) ของสารละลายเอทานอลมาตรฐานมาทำการวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง GC ที่มี FID เป็นเครื่องตรวจวัด ร่วมกับการแก้สมการทางคณิตศาสตร์ทำให้สามารถหาค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งละลาย (K) ของเอทานอลระหว่างวสุภาคของเหลวและวสุภาคแก๊สได้ โดยค่า K ของเอทานอลที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างที่ความดันบรรยากาศ อุณหภูมิ 50 °ซ ในภาวะที่มีการเขย่า vial เป็นเวลา 30 นาที มีค่าเท่ากับ 3.013 ซึ่งเป็นค่าคงที่จำเพาะ ดังนั้นจึงสามารถนำค่า K ที่ได้มาใช้ในการหาปริมาณเอทานอลที่มีอยู่ในเครื่องต้มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ โดยใช้ภาวะการทดลองเดียวกันได้อย่างแม่นยำ และพบว่าน้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายตัวอย่างไม่มีผลกระทบต่อการวัดปริมาณเอทานอลโดยวิธีนี้ ในขณะที่ความสามารถของเครื่องตรวจวัด FID สามารถวัดปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ร้อยละ 12 ดังนั้นหากต้องการวัดสารตัวอย่างที่มีปริมาณเอทานอลสูงกว่านี้จำเป็นต้องมีการเจือจางสารตัวอย่างก่อน

อย่างไรก็ตามในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ระเหยได้เช่นนี้มีข้อที่ควรระวังและต้องคำนึงถึงอยู่เสมอคือความสม่ำเสมอในการเก็บรักษา และการควบคุมภาวะที่ใช้ในการทดลองให้มีความแม่นยำ และเท่ากันทุกตัวอย่างเพื่อป้องกันความผิดพลาดที่เกิดจากการทดลอง

6. เอกสารอ้างอิง

1. Piloni, G. J., 1985, "Determination of Ethanol in Wine by Titrimetric and Spectrophotometric Dichromate Methods: Collaborative Study," *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, Vol. 68, pp. 188-190.
2. Tipparat, P., Lapanantnoppakhun, S., Jakmunee, J., and Grudpan, K., 2001, "Determination of Ethanol in Liquor by Near-infrared Spectrophotometry with Flow Injection," *Talanta*, Vol. 53, pp. 1199-1204.
3. Gonzalez-Rodriguez, J., Perez-Juan, P., and Luque De Castro, M. D., 2003, "Determination of Ethanol in Beverages by Flow Injection, Pervaporation and Density Measurements," *Talanta*, Vol. 59, pp. 691-696.
4. Mendes, L. S., Oliveira, F. C. C., Suarez, P. A. Z., and Rubim, J. C., 2003, "Determination of Ethanol in Fuel Ethanol and Beverages by Fourier Transform (FT)-near Infrared and FT-Raman Spectrometries," *Analytica Chimica Acta*, Vol. 493, pp. 219-231.
5. Gallignani, M., Garrigues, S., and Guardia, M. D. I., 1994, "Derivative Fourier Transform Infrared Spectrometric Determination of Ethanol in Alcoholic Beverages," *Analytica Chimica Acta*, Vol. 287, pp. 275-283.
6. Wang, M.-L., Choong, Y.-M., Su, N.-W. and Lee, M.-S., 2003, "A Rapid Method for Determination of Ethanol in Alcoholic Beverages using Capillary Gas Chromatography," *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 11, pp. 133-140.
7. Wang, M.-L., Wang, J.-T., and Choong, Y.-M., 2004, "Simultaneous Quantification of Methanol and Ethanol in Alcoholic Beverage using a Rapid Gas Chromatographic Method Coupling with Dual Internal Standards," *Food Chemistry*, Vol. 86, pp. 609-615.
8. AOAC Official Method 972.11, "Methanol in Distilled Liquors-Gas Chromatographic Method," *AOAC International*, Code No. 26.1. pp. 136.

9. Samadi-Maybodi, A., Shariat, M. R., Zarei, M., and Rezai, M. B., 2002, "Headspace Analysis of the Male and Female Flowers of Kiwifruit Grown in Iran," *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 14, pp. 414-415.
10. Tava, A., Pecetti, L., Povolò, M., and Contarini, G., 2000, "A Comparison between Two Systems of Volatile Sampling in Flowers of Alfalfa (*Medicago sativa* L.)," *Phytochemical Analysis*, Vol. 11, pp. 148-152.
11. Sanches-Silva, A., Rodriguez-Bernaldo De Quiros, A., Lopez-Hernandez, J., and Paseiro-Losada, P., 2004, "Determination of Hexanal as Indicator of the Lipidic Oxidation State in Potato Crisps using Gas Chromatography and High-performance Liquid Chromatography," *Journal of Chromatography A*, Vol. 1046, pp. 75-81.
12. Romeu-Nadal, M., Castellote, A. I., and Lopez-Sabater, M. C., 2004, "Headspace Gas Chromatographic Method for Determining Volatile Compounds in Infant Formulas," *Journal of Chromatography A*, Vol. 1046, pp. 235-239.
13. Doleschall, F., Kermený, Z., Recseg, K., and Kovari, K., 2001, "Monitoring of Lipid Degradation Products by Solid-phase Microextraction," *Journal of Microcolumn Separations*, Vol. 13, pp. 215-220.
14. Snow, N. H., 2002, "Head-space analysis in modern gas chromatography," *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 21, pp. 608-617.
15. Katritzky, A. R., Kuanar, M., Fara, D. C., Karelson, M., and Acree Jr., W. E., 2004, "QSPR Treatment of Rat Blood:air, Saline:air and Olive Oil:air Partition Coefficients using Theoretical Molecular Descriptors," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, Vol. 12, pp. 4735-4748.
16. Krisnangkura, K., Tancharoon, A., Konkao, C., and Jeyashoke, N., 1997, "An Alternative Method for the Calculation of Equivalent Chain Length or Carbon Number of Fatty Acid Methyl Esters in Gas Chromatography," *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 35, pp. 329-332.
17. Hussam, A. and Carr, P. W., 1985, "Rapid and precise method for the measurement of Vapor/Liquid Equilibria by Headspace Gas Chromatography," *Analytical Chemistry*, Vol. 57, pp. 793-801.

18. Kolb, B., Welter, C., and Bichler, C., 1992, "Determination of Partition Coefficients by Automatic Equilibrium Headspace Gas Chromatography by Vapor Phase Calibration," *Chromatographia*, Vol. 34, pp. 235-240.
19. Ettre, L. S. and Kolb, B., 1991, "Headspace-gas Chromatography: The Influence of Sample Volume on Analytical Results," *Chromatographia*, Vol. 32, pp. 5-12.
20. Ettre, L. S., Welter, C. and Kolb, B., 1993, "Determination of Gas-liquid Partition Coefficients by Automatic Equilibrium Headspace-gas Chromatography Utilizing the Phase Ratio Variation Method," *Chromatographia*, Vol. 35, pp. 73-84.
21. Jouquand, C., Ducruet, V., and Giampaoli, P., 2004, "Partition Coefficients of Aroma Compounds in Polysaccharide Solutions by the Phase Ratio Variation Method," *Food Chemistry*, Vol. 85, pp. 467-474.
22. Bakierowska, A.-M. and Trzeszczynski, J., 2003, "Graphical Method for the Determination of Water/gas Partition Coefficients of Volatile Organic Compounds by a Headspace Gas Chromatography Technique," *Fluid Phase Equilibria*, Vol. 213, pp. 139-146.
23. Chai, X. S. and Zhu, J. Y., 1998, "Indirect Headspace Gas Chromatographic Method for Vapor-liquid Phase Equilibrium Study," *Journal of Chromatography A*, Vol. 799, pp. 207-214.
24. Strassnig, S. and Lankmayr, E. P., 1999, "Elimination of Matrix Effects for Static Headspace Analysis of Ethanol," *Journal of Chromatography A*, Vol. 849, pp. 629-636.

