

Zygmunt Burnus
Instytut Nafty i Gazu, Kraków

Nowa metoda oznaczania sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Wstęp

Estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME) stanowią odnawialne źródło energii, ze względu na wykorzystanie do ich produkcji olejów roślinnych. Fakt ten miał zasadniczy wpływ na zwrócenie się w kierunku wykorzystania tego surowca jako biopaliwa w latach 70. ub. wieku. Wstępne badania wykazały duże podobieństwo FAME do oleju napędowego pod względem właściwości fizykochemicznych, stwierdzono również możliwość mieszania obydwu paliw w szerokim zakresie stężeń. Do roku 2000, a szczególnie w latach 90. ub. wieku, przeprowadzono wiele badań silnikowych, mających na celu potwierdzenie możliwości zastosowania czystych estrów metylowych kwasów tłuszczowych jako paliwa do silników z zapłonem samoczynnym. Poza licznymi korzystnymi aspektami proekologicznymi zastosowania estrów metylowych kwasów tłuszczowych, stwierdzono, że w porównaniu z olejem

napędowym posiadają one jednak kilka wad – m.in. zwiększone jednostkowe zużycie paliwa, zwiększenie osadów w komorze spalania silnika, jak również zwiększenie emisji tlenków azotu. Przemysł motoryzacyjny nie zaakceptował dowolnego stosowania estrów metylowych kwasów tłuszczowych w pojazdach wyposażonych w silniki wysokoprężne. Do powszechnego stosowania dopuszczono jedynie olej napędowy z zawartością do 5% (V/V) FAME, który nie wykazywał niekorzystnego wpływu na silniki wysokoprężne, a wpływał pozytywnie na proces spalania paliwa i poprawiał parametry emisji spalin. Czyste estry metylowe kwasów tłuszczowych są obecnie dostępne na stacjach paliw w Unii Europejskiej, ale stosuje się głównie do zasilania ciągników rolniczych, a także w innych pojazdach wyposażonych w silniki wysokoprężne przystosowane do spalania tego biopaliwa.

Wymagania jakościowe dla estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Obecnie na obszarze Unii Europejskiej wymagania jakościowe dla estrów metylowych kwasów tłuszczowych stosowanych jako samoistne paliwo do silników z zapłonem samoczynnym określa norma europejska EN 14214+A1:2009 [4]. W Polsce wymagania jakościowe dla FAME są identyczne z zawartymi w powyższej normie europejskiej, a specyfikuje je Rozporządzenie Ministra Gospodarki z dnia 22 stycznia 2009 r. w sprawie wymagań jakościowych dla biopaliw ciekłych [10]. Szczegółowe wymagania wymienione w powyższym Rozporządzeniu Ministra Gospodarki, dotyczące estrów metylowych kwasów tłuszczowych stanowiących samoistne paliwo do silników Diesla, przedstawiono w tablicy 1.

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Gospodarki z dnia 22 kwietnia 2010 r. w sprawie metod badania jakości biopaliw ciekłych [9], jedyną dopuszczoną do stosowania metodą oznaczania zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych jest metoda według normy PN-EN 14103:2004 *Produkty przetwarzania olejów i tłuszczów. Estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME). Oznaczanie zawartości estrów i estru metylowego kwasu linolenowego* [6].

Zasada wymienionej metodyki polega na zastosowaniu techniki chromatografii gazowej z detekcją płomieniowo-jonizacyjną FID i wykorzystaniem estru metylowego kwasu heptadekanowego C_{17:0} jako wzorca wewnętrznego.

Tablica 1. Obowiązujące w Polsce wymagania jakościowe dla estrów metylowych kwasów tłuszczowych stanowiących samoistne paliwo [10]

Właściwość FAME	Jednostka	Zakres wymagania			
		minimum	maksimum		
Zawartość estrów metylowych kwasów tłuszczowych	[% (m/m)]	96,5	-		
Gęstość w temperaturze 15°C	[kg/m ³]	860	900		
Lepkość w temperaturze 40°C	[mm ² /s]	3,50	5,00		
Temperatura zapłonu	[°C]	101	-		
Zawartość siarki	[mg/kg]	-	10,0		
Pozostałość po koksowaniu	[% (m/m)]	-	0,30		
Liczba cetanowa	-	51,0	-		
Zawartość popiołu siarczanowego	[% (m/m)]	-	0,02		
Zawartość wody	[mg/kg]	-	500		
Zawartość zanieczyszczeń stałych		-	24		
Badanie działania korodującego na miedzi	stopień korozji	stopień korozji 1			
Stabilność oksydacyjna w temperaturze 110°C	[h]	6,0	-		
Liczba kwasowa	[mg KOH/g]	-	0,50		
Liczba jodowa	[g jodu/100g]	-	120		
Zawartość estru metylowego kwasu linolenowego	[% (m/m)]	-	12,0		
Zawartość estrów metylowych kwasów polienowych		-	1		
Zawartość metanolu		-	0,20		
Zawartość monoacylogliceroli		-	0,80		
Zawartość diacylogliceroli		-	0,20		
Zawartość triacylogliceroli		-	0,20		
Zawartość wolnego glicerolu		-	0,02		
Zawartość ogólnego glicerolu		-	0,25		
Zawartość metali grupy I (Na + K)	[mg/kg]	-	5,0		
Zawartość metali grupy II (Ca + Mg)		-	5,0		
Zawartość fosforu		-	4,0		
Temperatura zablokowania zimnego filtra (CFPP) ^{*)}	[°C]	-	0	-10	-20

^{*)} Wartości odpowiednio dla okresu letniego, przejściowego i zimowego.

Metody oznaczania zawartości FAME

W zbiorze polskich norm – spośród znormalizowanych metod badania sumarycznej zawartości FAME – zamieszczona została jedynie polska wersja europejskiej normy EN 14103:2004. Interesującym faktem jest brak odpowiednika tej normy w Stanach Zjednoczonych, zgodnie ze specyfikacją ASTM D 6751-09a, dla B100 – czystych FAME stosowanych jako komponent paliwowy [1]. Oznaczana jest większość parametrów wymienionych w tablicy 1, z wyjątkiem oznaczania zawartości FAME, ich gęstości oraz zawartości estrów metylowych kwasu linolenowego i kwasów polienowych. Może to świadczyć o przekonaniu, że spełnienie wszystkich pozostałych parametrów dla

estrów metylowych kwasów tłuszczowych gwarantuje ich prawidłową jakość. Z doświadczeń uzyskanych w Instytucie Nafty i Gazu podczas badania jakości FAME B100 wynika, że parametrem decydującym o jakości FAME jest oznaczenie zawartości mono-, di- i triacylogliceroli oraz wolnego i ogólnego glicerolu, oznaczanego zgodnie z normą PN-EN 14105 [7] lub jej amerykańskim odpowiednikiem – normą ASTM D6584-08 [2].

W literaturze nie znaleziono żadnej informacji o innej, alternatywnej metodzie oznaczania sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych (poza już cytowaną PN-EN 14103:2004); opisano jedynie metody

przygotowania próbek i oznaczania składu kwasów tłuszczowych w różnych matrycach. Podczas analiz składu kwasów tłuszczowych najczęściej stosuje się układ chromatografu gazowego, z dozownikiem umożliwiającym stosowanie dzielnika strumienia (*split/splitless*), kolumną z fazą polarną typu Carbowax 20M, a także detektorem płomieniowo-jonizacyjnym FID [11, 12]. Układ taki został zastosowany również w metodzie opisanej w normie

PN-EN 14103:2004 oraz w normie PN-EN ISO 5508:1996 [8], dotyczącej jedynie oznaczania składu kwasów tłuszczowych. W tabelicy 2 podano parametry metody PN-EN 14103:2004, w zestawieniu z warunkami podanymi w wybranych pozycjach literaturowych.

Precyzja podana w normie PN-EN 14103 wskazuje, że metoda ta jest niewystarczająca do oznaczania dokładnej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Tablica 2. Zestawienie parametrów metody według PN-EN 14103:2004, na tle wybranych pozycji literaturowych

Warunki	Metoda według PN-EN 14103 [6]	Metoda według PN-EN ISO 5508 [8]	Praca Ulbertha i Schrammela [12]
Rodzaj badanego produktu	Estry metylowe kwasów tłuszczowych pomiędzy C ₁₄ i C ₂₄	Estry metylowe kwasów tłuszczowych	Estry metylowe kwasów tłuszczowych
Zakres metody dla zawartości estrów	Powyżej 90% (m/m)	Nie podano	Nie podano
Dozownik	Dzielnikowy, przepływ 20 ml/min do 100 ml/min	Dzielnikowy lub bezdzielnikowy	Dzielnikowy lub bezpośredni (<i>on column</i>)
Temperatura dozownika	250°C	200°C	Nie podano
Gaz nośny	Wodór lub hel	Azot, hel, argon, wodór i inne	Wodór
Przepływ gazu nośnego	1±2 ml/min	Nie podano	3,02 ml/min
Objętość dozy	Nie podano	Od 0,5 µl do 2 µl	1 µl
Wzorzec wewnętrzny	Ester metylowy kwasu heptadekanowego C _{17:0}	Brak	Brak
Przygotowanie wstępne próbki	Naważka 250 mg próbki i dodatek 5 ml roztworu wzorca wewnętrznego o stężeniu około 10 mg/ml	Według PN-EN ISO 5509	Rozpuszczenie próbki estrów w rozpuszczalniku
Program temperatury termostatu	Izoterma 200°C lub 210°C	Izoterma 180°C lub 200°C	Izoterma początkowa 40°C przez 4 min, przyrost 10°C/min do 140°C, izoterma 1 min, przyrost 5°C/min do 220°C, izoterma końcowa 10 min
Kolumna chromatograficzna	Jedna spośród podanych poniżej: – 30 m × 0,32 mm × 0,25 µm faza Carbowax 20M lub DB-Wax lub CP-Wax – 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm faza Carbowax 20M lub DB-Wax lub CP-Wax	Dopuszczalne kolumny pakowane i kapilarne. Spośród kapilarnych dopuszczalne o średnicach 0,2±0,8 mm, długości 25 m, o fazach grubości 0,1 µm lub 0,2 µm, typy faz: poliglikol, poliester lub polarny polisiloksan	30 m × 0,32 mm × 0,25 µm faza DB-Wax
Detektor	Detektor płomieniowo-jonizacyjny FID	Detektor płomieniowo-jonizacyjny FID lub cieplno-przewodnościowy TCD	Detektor płomieniowo-jonizacyjny FID
Temperatura detektora	250°C	Dla detektora FID – powyżej temperatury kolumny	250°C
Powtarzalność dla zawartości estrów	1,6% (m/m)	Powtarzalność dla składu estrów 1% (m/m)	Nie podano
Odtwarzalność dla zawartości estrów	3,1% (m/m)	Odtwarzalność dla składu estrów 3% (m/m)	Nie podano

w czystych estrach metylowych. Wymaganie dotyczące zawartości estrów (minimum 96,5% (m/m)), ujęte w Rozporządzeniu Ministra Gospodarki odnośnie *wymagań jakościowych dla biopaliw ciekłych*, podane jest z dokładnością do 0,1% (m/m), a wysoka wartość odtwarzalności podana w normie PN-EN 14013 (wynosząca 3,1% (m/m)) i obliczona na jej podstawie wartość tolerancji dla zawartości estrów 94,7% (m/m) powodują dopuszczenie do stosowania estrów metylowych o gorszych parametrach niż podane w specyfikacji. W Instytucie Nafty i Gazu potrzebna była metodyka cechująca się znacznie wyższą dokładnością, w celu realizacji prac badawczych z zakresu zmian zachodzących w estrach metylowych kwasów tłuszczowych.

W celu opracowania metody dokładnego oznaczania sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych konieczne jest wyjaśnienie, dlaczego precyzja w normie PN-EN 14103 osiąga tak niskie wartości. Jedną z prawdopodobnych przyczyn tego jest sposób przygotowania próbki do badań. Mimo dużej prostoty w tym procesie, zastosowana ilość wzorca wewnętrznego jest pięciokrotnie mniejsza w stosunku do masy badanej próbki (dokładnie 50 mg wzorca zawartego w 5 ml roztworu o stężeniu 10 mg/ml i dokładnie 250 mg próbki). A zatem – niezgodnie z zasadami zastosowania metody wzorca wewnętrznego w chromatografii [5] – masa wzorca jest mniejsza od masy badanej substancji. W ten sposób dokładność wyznaczenia powierzchni piku wzorca wewnętrznego ma pięciokrotnie większy wpływ na wynik oznaczenia niż w przypadku właściwego sposobu wzorcowania. Dodatkowo roztwór wzorca wewnętrznego jest odmierzany objętościowo, co powoduje obniżenie dokładności metody.

Interesujące wyniki uzyskali w swojej pracy Ulberth i Shrammel [12]. Przebadali oni wpływ sposobu dozowania przy użyciu dozownika dzielnikowego (*split*) na wyniki oznaczeń estrów metylowych kwasów tłuszczowych i porównali to z najbardziej niedestrukcyjnym sposobem

dozowania – za pomocą dozownika bezpośredniego (*on column*). W ich pracy stwierdzono, że technika klasycznego dozowania – *split*, tzw. *filled needle injection* (z napełnioną igłą mikrostrzykawki, szybkim wprowadzeniem igły do dozownika, zadozowaniem i szybkim wysunięciem strzykawki), obciążona jest największym błędem analitycznym w uzyskiwanych wynikach zawartości estrów (powyżej 3%) oraz efektem dyskryminacji o wartości powyżej 3% dla cięższych składników próbki [12].

Jeżeli ta technika dozowania (stosowana standardowo w chromatografii) zostanie użyta również w metodzie według PN-EN 14103 do oznaczania sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych, może mieć ona duży wpływ na wynik oznaczenia, ponieważ błąd względny 3% odnoszony jest do wartości bliskiej 100%, a zatem będzie bardzo zbliżony do wartości błędu bezwzględnego.

Autorzy pracy [12] zbadali również inne techniki dozowania przy użyciu dozownika *split*. Najbardziej obiecujące wyniki, tzn. obciążone najniższym błędem i wskazujące na najniższą dyskryminację, uzyskano techniką tzw. *solvent flush injection*. Technika ta polega na napełnieniu igły rozpuszczalnikiem, cofnięciu tłoczka do poziomu 1 μ l w celu zaciągnięcia banieczki powietrza, a następnie wciągnięciu próbki do poziomu 2 μ l i ponownym wciągnięciu banieczki powietrza. Następnie dozowanie wykonuje się techniką *hot needle injection*, według której igłę mikrostrzykawki na 3 sekundy umieszcza się w dozowniku, po czym wykonuje się nastrzyk i szybko wysuwa igłę mikrostrzykawki z dozownika.

Podsumowując powyższe obserwacje, w zaproponowanej metodzie wprowadzono inny sposób wzorcowania; ze zwiększoną ilością wzorca wewnętrznego zbadano jego ewentualną zmianę, a także wyeliminowano pomiary objętościowe – zastępując je dokładniejszymi pomiarami masy. Dodatkowo sprawdzono wpływ sposobu dozowania na uzyskiwane wyniki oznaczeń sumarycznej zawartości estrów.

Metodyka badań

Wszystkie badania wykonano na chromatografie gazowym firmy Thermo Electron Corporation – model Trace GC Ultra. Jest on wyposażony w dozownik *split/splitless*, układ programowanej regulacji ciśnienia gazu nośnego, termostat umożliwiający programowanie temperatur do 450°C i detektor płomieniowo-jonizacyjny FID.

Do celów pracy, w układzie chromatograficznym zastosowano kolumnę 30 m \times 0,25 mm, z fazą 0,25 μ m AT-WAX, firmy Alltech Corp. USA.

Po przeprowadzeniu wstępnych prób stwierdzono, że

technika klasycznego dozowania przy użyciu dozownika *split* nie nadaje się do stosowania przy oznaczaniu sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Pod względem precyzji oznaczania estrów metylowych, najlepsze wyniki daje opisana wcześniej technika dozowania *solvent flush injection*, cechująca się bardzo dobrą powtarzalnością.

Zbadano, czy możliwe jest uzyskanie wyższej precyzji metody według PN-EN 14103:2004 jedynie dzięki zmianie sposobu dozowania próbki. Stwierdzono znaczną poprawę w dokładności uzyskiwanych wyników, jednakże

niezmieniona, niewłaściwa ilość wzorca wewnętrznego oraz przygotowanie objętościowe roztworu tego wzorca powodują, że wyniki te nadal nie są zadowalające.

Podczas opracowywania metody zdecydowano się na zastosowanie – jako wzorca wewnętrznego – estru metylowego kwasu pentadekanowego $C_{15:0}$. Stwierdzono, że umożliwi on uzyskiwanie identycznych wyników przy wagowym przygotowaniu próbki jak w przypadku estru metylowego kwasu heptadekanowego $C_{17:0}$, który został użyty w normie PN-EN 14103:2004. W obliczeniach uwzględniono różnicę we współczynniku odpowiedzi detektora FID dla tych związków. Współczynnik wyznaczono w ustalonych dla nowej metody warunkach pracy chromatografu. O wyborze estru metylowego kwasu pentadekanowego zdecydował ciekły stan skupienia tego związku w temperaturze pokojowej, który ułatwia przygotowanie próbki do badań.

Wzorec estru metylowego kwasu heptadekanowego jest stały w temperaturze pokojowej, z tendencją do przechodzenia w stan ciekły przy niewielkim podniesieniu temperatury, co nieznacznie utrudnia przygotowanie próbki. Dodatkowo o wyborze wzorca zdecydowała cena zakupu wzorcowego estru metylowego kwasu pentadekanowego – znacznie niższa niż wzorcowego estru metylowego kwasu heptadekanowego. Pentadekanian metylu jest estrem metylowym kwasu pentadekanowego, o piętnastu atomach węgla w cząsteczce. Praktycznie nie występuje on w dostępnych paliwach FAME, zatem doskonale nadaje się jako wzorec wewnętrzny do oznaczania sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych.

Wzorcowe estry metylowe kwasów tłuszczowych FAME, o całkowitej zawartości estrów 97,6%, pozyskano z Institute for Interlaboratory Studies w Holandii.

Część doświadczalna

Do zważonej z dokładnością 0,0001 g fiołki szklanej, o pojemności 2 ml, odmierzano 75 μ l próbki, za pomocą mikrostrzykawki o pojemności 100 μ l. Fiołkę z próbką zważono z dokładnością 0,0001 g, po czym – za pomocą mikrostrzykawki o pojemności 100 μ l – odmierzone 50 μ l wzorca wewnętrznego (pentadekanianu metylu) i całość zważono. Do fiołki dodano około 1 ml n-heptanu, a następnie ją zakapslowano.

Do badań przyjęto następujące warunki pracy chromatografu gazowego:

- program temperaturowy termostatu:
 - izoterma początkowa: 210°C przez 17 minut,
 - przyrost temperatury: do 220°C z szybkością 2°C/min,
 - izoterma końcowa: 220°C przez 14 minut,
- program ciśnienia gazu nośnego:
 - izobara początkowa: 220 kPa przez 17 minut,
 - przyrost ciśnienia: do 250 kPa z szybkością 3 kPa/min,
 - izobara końcowa: 250 kPa przez 15 minut,
- czas analizy: 36 minut,

- temperatura dozownika *split*: 250°C,
- współczynnik podziału strumienia w dozowniku *split*: 1:50,
- temperatura detektora płomieniowo-jonizacyjnego FID: 280°C,
- natężenie przepływu wodoru i powietrza do detektora: według instrukcji chromatografu.

Jako sposób dozowania próbki wybrano technikę *solvent flush injection/hot needle injection*, na którą składają się następujące czynności [12]:

- przemycie i napełnienie igły mikrostrzykawki rozpuszczalnikiem,
- cofnięcie tłoczka do poziomu 1,0 μ l w celu zaciągnięcia banieczki powietrza,
- wciągnięcie próbki do poziomu 2,0 μ l,
- cofnięcie tłoczka do poziomu 3,0 μ l w celu wciągnięcia banieczki powietrza,
- umieszczenie igły mikrostrzykawki w dozowniku na 3 sekundy i wykonanie nastrzyku do dozownika *split*.

Obszar identyfikacji oraz integracji pików

W celu ustalenia czasów retencji pików estrów metylowych kwasów tłuszczowych oraz wzorca wewnętrznego – estru metylowego kwasu pentadekanowego $C_{15:0}$ – wykonano chromatogram dla wzorcowych estrów metylowych B100, uzyskanych od Institute for Interlaboratory Studies w Holandii w roku 2009, przygotowanych metodą opisaną w niniejszej pracy. Zgodnie z zapisami podanymi w normie

PN-EN 14103:2004, obszar integracji pików objął estry metylowe kwasów tłuszczowych od 14 do 24 atomów węgla w cząsteczce, pod względem długości łańcucha kwasu tłuszczowego.

Uzyskane czasy retencji wyniosły odpowiednio:

- ester metylowy kwasu pentadekanowego (wzorec wewnętrzny): 3,78 minuty,

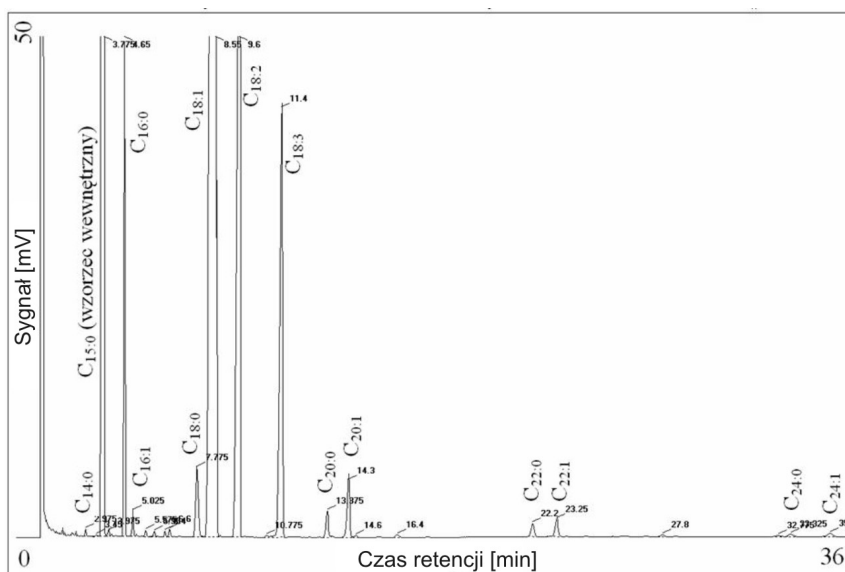
- estry metylowe kwasów tłuszczowych: $C_{14:0}$ – 2,98; $C_{16:0}$ – 4,65; $C_{16:1}$ – 5,03; $C_{18:0}$ – 7,78; $C_{18:1}$ – 8,55; $C_{18:2}$ – 9,60; $C_{18:3}$ – 11,40; $C_{20:0}$ – 13,38; $C_{20:1}$ – 14,30; $C_{22:0}$ – 22,20; $C_{22:1}$ – 23,25; $C_{24:0}$ – 33,33 oraz $C_{24:1}$ – 35,00 minut.

Chromatogram z tej analizy przedstawiono na rysunku 1.

Na chromatogramie widoczne są piki estrów metylowych kwasów tłuszczowych o ilości od 14 do 24 atomów węgla w cząsteczce. Pozostałe piki, znajdujące się pomiędzy pikami zidentyfikowanymi, również podlegają

integracji – według zapisu znajdującego się w normie PN-EN 14103:2004. Przy obliczeniach brana jest pod uwagę zarówno sumaryczna powierzchnia wszystkich pików w opisanym powyżej obszarze retencji, jak i powierzchnia piku estru metylowego kwasu pentadekanowego.

W razie potrzeby metoda ta może służyć również do dokładnego oznaczania składu kwasów tłuszczowych w estrach metylowych tych kwasów – wówczas jednak w integracji nie bierze się pod uwagę estru metylowego kwasu pentadekanowego.



Rys. 1. Chromatogram estrów metylowych kwasów tłuszczowych próbki B100 z badań okrężnych Institute for Interlaboratory Studies w Holandii (2009 r.)

Wykonanie analiz rozpuszczalników i materiałów wzorcowych

Przed przystąpieniem do wykonania analiz ilościowych dla estrów metylowych kwasów tłuszczowych sprawdzono czystość zastosowanego rozpuszczalnika – n-heptanu oraz materiałów wzorcowych – estrów metylowych kwasu pentadekanowego i heptadekanowego. Są to czynności niezbędne do dokładnego oznaczania sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych, ponieważ czystość wzorców ma bezpośredni wpływ na wynik oznaczenia. Dodatkowo, konieczne jest też wyznaczenie względnego współczynnika odpowiedzi detektora płomieniowo-jonizacyjnego FID dla estru metylowego kwasu

$C_{15:0}$ w stosunku do $C_{17:0}$. Na chromatogramie uzyskanym dla n-heptanu nie stwierdzono obecności pików zanieczyszczeń, natomiast zaobserwowano je w przypadku materiałów wzorcowych.

Oznaczona tą metodą czystość wzorców była zgodna z certyfikatem uzyskanym od producenta. Czystości estru metylowego kwasu pentadekanowego $C_{15:0}$ oraz estru metylowego kwasu heptadekanowego, uzyskane w warunkach metody, wyniosły odpowiednio: 99,732% (*m/m*) i 99,468% (*m/m*). Wartości te zostały uwzględnione podczas obliczeń.

Wyznaczenie względnego współczynnika odpowiedzi detektora płomieniowo-jonizacyjnego dla wzorca wewnętrznego

W celu wyznaczenia względnego współczynnika odpowiedzi detektora płomieniowo-jonizacyjnego FID dla

estru metylowego kwasu pentadekanowego $C_{15:0}$ względem estru metylowego kwasu heptadekanowego $C_{17:0}$, przygo-

towano roztwór zawierający zbliżone do siebie zawartości obydwu związków chemicznych. Do fiolki o pojemności 2 ml naważono po 50 mg każdej z substancji, z dokładnością do 0,0001 g. Do fiolki dodano 1 ml n-heptanu.

Tak przygotowany roztwór analizowano ośmiokrotnie. Względny współczynnik odpowiedzi detektora wyznaczono jako stosunek naważonych mas estru C_{15:0} i estru C_{17:0} do uzyskanych powierzchni pików tych estrów.

Analiza wzorcowych estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Wzorcowe estry metylowe kwasów tłuszczowych – pozyskane od Institute for Interlaboratory Studies w Holandii, o zawartości estrów równej 97,6% (m/m), wyznaczonej w międzynarodowych badaniach międzylaboratoryjnych przeprowadzonych w roku 2009 – przygotowano i przeanalizowano pięciokrotnie. Odczytano sumaryczne powierzchnie pików estrów metylowych kwasów tłuszczowych oraz wzorca wewnętrznego estru metylowego kwasu pentadekanowego. Zawartość estrów metylowych kwasów tłuszczowych C_{FAME} obliczano zgodnie ze wzorem:

$$C_{FAME} = \frac{A_{TOTAL} - A_{wz}}{A_{wz}} \cdot \frac{m_{wz}}{m_{pr}} \cdot \frac{1}{1,0173} \cdot 100\% \quad (1)$$

gdzie:

A_{TOTAL} – całkowita powierzchnia pików estrów od C₁₄ do C_{24:1},

A_{wz} – powierzchnia pików wzorca wewnętrznego,

m_{wz} – masa wzorca wewnętrznego [g],

m_{pr} – masa próbki [g],

1,0173 – względny współczynnik odpowiedzi FID dla C_{15:0}/C_{17:0}.

Wyniki tych oznaczeń przedstawiono w tabelicy 3.

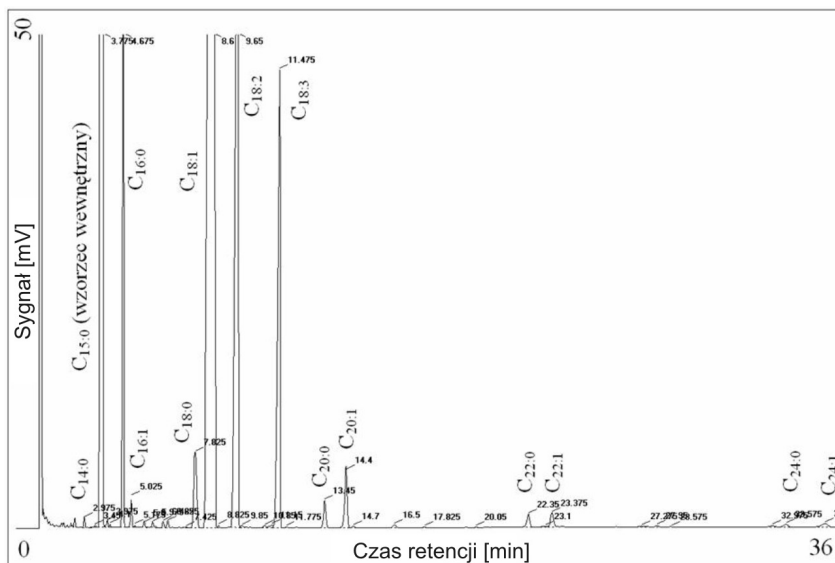
Tablica 3. Wyniki oznaczeń dla wzorcowych estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Zawartość estrów metylowych kwasów tłuszczowych [% (m/m)]	Parametry statystyczne
97,7	Wartość średnia: 97,7% (m/m) Odchylenie standardowe: 0,1483% (m/m) Współczynnik zmienności: 0,1518% Powtarzalność wyznaczona według ASTM D 691: 0,42% (m/m)
97,5	
97,7	
97,8	
97,9	

Analiza próbek pod kątem sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Podczas badania próbek o zawartości estrów powyżej 90% (m/m), z dokładnością do 0,1% (m/m), próbkę przygotowano w sposób analogiczny jak w przypadku wzorcowych estrów metylowych i wykonywano dwa oznaczenia. Na rysunku 2 przedstawiono chromatogram z analizy jednej z próbek handlowych estrów metylowych kwasów tłuszczowych, analizowanych wcześniej dla klientów zewnętrznych.

Z uzyskanej sumarycznej powierzchni pików estrów i powierzchni pików wzorca wewnętrznego, odczytanych za pomocą programu Chrom-Card, obliczono zawartość estrów metylowych kwasów tłuszczowych C_{FAME} zgodnie ze wzorem (1).



Rys. 2. Chromatogram handlowej próbki FAME. Oznaczenie sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Wyznaczenie powtarzalności metody oznaczania sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Celem określenia powtarzalności metody przeanalizowano szereg próbek rzeczywistych i wzorcowych, pod kątem zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych (w zakresie metody). Dla każdej próbki wykonano dwa oznaczenia. Obliczono odchylenie standardowe dla wartości średniej, a następnie oszacowano powtarzalność, zgodnie z normą ASTM E 691, według wzoru [3]:

$$r_{obl} = s \times 2,8 \quad (2)$$

gdzie s – odchylenie standardowe.

Uzyskane wartości przedstawiono w tabelicy 4.

Nie stwierdzono zależności liniowej powtarzalności oznaczeń od zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Najwyższa wartość wyznaczonej powtarzalności wyniosła 0,79% wyniku oznaczenia i jest ona dwukrotnie niższa od podanej w normie PN-EN 14103:2004.

Tablica 4. Wyznaczenie powtarzalności metody oznaczania sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Nazwa próbki	Wyniki oznaczeń [% (m/m)]	Średni wynik oznaczenia [% (m/m)]	Odchylenie standardowe	Powtarzalność oszacowana – r_{obl} , według ASTM E 691 [% (m/m)]
Wzorzec 1	97,8	97,85	0,0707	0,20
	97,9			
Wzorzec 2	97,3	97,35	0,0707	0,20
	97,4			
Próbka 1	97,4	97,60	0,2828	0,79
	97,8			
Wzorzec 3	97,0	96,95	0,0707	0,20
	96,9			
Próbka 2	96,3	96,50	0,2828	0,79
	96,7			
Próbka 3	97,8	97,60	0,2828	0,79
	97,4			
Wzorzec 4	97,4	97,35	0,0707	0,20

Sprawdzenie dokładności metody

W celu sprawdzenia dokładności metody przeanalizowano próbkę wzorcowych estrów metylowych kwasów tłuszczowych, o zawartości estrów równej 97,6% (m/m). Dla próbki wykonano 7 oznaczeń, których wyniki podano z dokładnością 0,01% (m/m). Za pomocą testu Dixona, przy poziomie ufności 95%, stwierdzono brak błędów grubych. W celu sprawdzenia dokładności metody zastosowano test istotności, porównując wartość średnią z oznaczeń \bar{x} i wartość prawdziwą τ przy poziomie ufności 95%. Wartość statystyki t obliczono według wzoru:

$$t_{obl} = \left| \tau - \bar{x} \right| \cdot \frac{\sqrt{n}}{s} \quad (3)$$

gdzie:

n – liczba oznaczeń,

s – odchylenie standardowe.

Uzyskaną wartość porównano z wartością odczytaną z tablic rozkładu t -Studenta na poziomie ufności 95%, dla sześciu oznaczeń.

Wartość obliczona (t_{obl}) dla oznaczania sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych w próbce wzorcowej jest mniejsza od wartości krytycznej (t_{kryt}), zatem wdrożona metodyka umożliwia uzyskiwanie

Tablica 5. Test dokładności metody oznaczania sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Oznaczenie	Estry metylowe kwasów tłuszczowych [% (m/m)]
Wartość prawdziwa – τ [mg/kg]	97,60
1	97,76
2	97,94
3	97,06
4	97,26
5	97,31
6	97,36
7	97,33
Wartość średnia – \bar{x}	97,43
Odchylenie standardowe – s	0,3066
t_{obl}	1,454
$t_{kryt}(P = 0,95; f = 7)$	2,447
$t_{obl} < t_{kryt}$	Tak

dokładnych wyników oznaczania estrów metylowych kwasów tłuszczowych przy badanym poziomie stężeń.

Określenie niepewności metody oznaczania sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Na niepewność metody składają się niepewności cząstkowe, wynikające z:

- czystości zastosowanych materiałów wzorcowych,
- przygotowania próbki,
- powtarzalności wykonywanych oznaczeń,
- błędów integracji pików na chromatogramie.

Równanie pomiaru dla oznaczania sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych, biorąc pod uwagę wzór (1), po uproszczeniu można zapisać w następujący sposób:

$$C_{FAME} = A \cdot \frac{m_{wz}}{m_{pr}} \cdot \frac{1}{K} \quad (4)$$

gdzie:

C_{FAME} – zawartość estrów metylowych kwasów tłuszczowych [% (m/m)],

A – iloraz powierzchni pików estrów i powierzchni pików wzorca wewnętrznego,

m_{wz} – masa wzorca wewnętrznego,

m_{pr} – masa próbki,

K – względny współczynnik odpowiedzi FID dla $C_{15:0}/C_{17:0}$.

Ze względu na wysoką dokładność wyznaczania powierzchni pików przez program integrujący, niepewność wyznaczenia czynnika A jest do pominięcia, zatem niepewność wynikająca z określenia wielkości zawartych w równaniu (4) wyraża się wzorem:

$$u(C_{FAME}) = \sqrt{u^2(m_1) + u^2(m_2) + u^2(K)} \quad (5)$$

gdzie:

$u(m_1)$ – niepewność naważki wzorca wewnętrznego,

$u(m_2)$ – niepewność naważki badanej próbki,

$u(K)$ – niepewność wyznaczenia względnego współczynnika odpowiedzi detektora FID dla $C_{15:0}/C_{17:0}$.

Niepewność związaną z wyznaczeniem względnego współczynnika odpowiedzi detektora FID dla $C_{15:0}/C_{17:0}$ podano poniżej.

Wyznaczona wartość względnego współczynnika odpowiedzi detektora FID dla $C_{15:0}/C_{17:0}$ K	Niepewność wyznaczenia względnego współczynnika odpowiedzi detektora FID dla $C_{15:0}/C_{17:0}$ $u(K)$
1,0173	0,0023

Niepewność związana z czystością materiałów wzorcowych do sporządzenia roztworów wzorcowych przyjmie postać:

$$u_w^2(P) = \frac{u(P_1)}{P_1} + \frac{u(P_2)}{P_2} \quad (6)$$

$$u_w^2(P) = \frac{0,289^2}{99,5^2} + \frac{0,289^2}{99,5^2}$$

$$u_w^2(P) = 1,687 \cdot 10^{-5}$$

Po uwzględnieniu niepewności związanych z powtarzalnością metody, równanie wyrażające niepewność oznaczania sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych przyjmie ostatecznie postać:

$$u(C_{FAME}) = C_{FAME} \cdot \sqrt{\left[\sum_1^2 \frac{u^2(m_i)}{m_i^2} \right] + u_w^2(K) + \left[\frac{u^2(P_1)}{P_1^2} + \frac{u^2(P_2)}{P_2^2} \right] + u_w^2(r_{FAME})} \quad (7)$$

Następnie obliczono niepewność oznaczania estrów metylowych kwasów tłuszczowych:

$$u(C_{FAME}) = C_{FAME} \cdot \sqrt{\frac{0,000058^2}{0,07^2} + \frac{0,000058^2}{0,05^2} + \frac{0,0023^2}{1,0173^2} + 2 \cdot \frac{0,289^2}{99,5^2} + \frac{0,2828^2}{96,50^2}}$$

Niepewność złożona oznaczania estrów metylowych kwasów tłuszczowych wynosi więc:

$$u(C_{FAME}) = C_{FAME} \times 0,006$$

a niepewność rozszerzona (przy $k = 2$; $P = 95\%$):

$$U(C_{FAME}) = C_{FAME} \times 2 \times 0,006 = C_{FAME} \times 0,012$$

Dla oznaczania sumarycznej zawartości estrów metylowych kwasów tłuszczowych wynik pomiaru (C_{FAME}) należy podawać z niepewnością rozszerzoną, w następujący sposób:

$$C_{FAME} \pm C_{FAME} \times 0,012 \quad (8)$$

Podsumowanie

Opracowaną metodę badania można z powodzeniem zastosować w analityce próbek estrów metylowych kwasów tłuszczowych, w celu dokładnego oznaczania sumarycznej zawartości tych estrów – z dokładnością co najmniej dwukrotnie wyższą względem normy PN-EN 14103. Do zalet opracowanej metody można dodatkowo zaliczyć

uproszczenie procesu przygotowania próbki, jak również obniżenie kosztów zakupu materiałów wzorcowych.

Dzięki poprawieniu precyzji, niniejszą nową metodę można z powodzeniem zastosować w pracach badawczych z zakresu analizy zmian zachodzących w estrach metylowych kwasów tłuszczowych.

Artykuł nadesłano do Redakcji 17.01.2011 r. Przyjęto do druku 28.04.2011 r.

Recenzent: prof. dr Michał Krasodomski

Literatura

- [1] ASTM D 6751-09a *Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels*.
- [2] ASTM D 6854-08 *Standard Test Method for Determination of Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography*.
- [3] ASTM E 691 *Standard Practice for Conducting an Interlaboratory Study to Determine the Precision of a Test Method*.
- [4] EN 14214+A1:2009 *Automotive fuels. Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines. Requirements and test methods*.
- [5] Lopez C.: *Chromatografia. Cz. VII – Analiza Ilościowa*. Tekst oryginalny przetłumaczony za zgodą autora, Hierasimczyk K., Wardenicki W., Namieśnik J., Politechnika Gdańska, s. 7–8, 2002.
- [6] PN-EN 14103:2004 *Produkty przetwarzania olejów i tłuszczów. Estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME). Oznaczanie zawartości estrów i estru metylowego kwasu linolenowego*.
- [7] PN-EN 14105:2004 *Produkty przetwarzania olejów i tłuszczów – Estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME) – Oznaczanie zawartości wolnego i ogólnego glicerolu oraz mono-, di- i triacylogliceroli*.
- [8] PN-EN ISO 5508:1996 *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej*.
- [9] Rozporządzenie Ministra Gospodarki z dnia 22 kwietnia 2010 r. w sprawie metod badania jakości biopaliw ciekłych, Dziennik Ustaw nr 78, poz. 520.
- [10] Rozporządzenie Ministra Gospodarki z dnia 22 stycznia 2009 r. w sprawie wymagań jakościowych dla biopaliw ciekłych, Dziennik Ustaw nr 18, poz. 98.
- [11] Schreiner M., Hulan H.W.: *Determination of carbon deficiency in the flame ionization detector response of long-chain fatty acid methyl esters and dicarboxylic acid methyl esters*. Journal of Chromatography A, 1045, 197–202, 2004.
- [12] Ulberth F., Schrammel F.: *Accurate quantitation of short-, medium- and long-chain fatty acid methyl esters by split-injection capillary gas-liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 704, 455–463, 1995.



Mgr inż. Zygmunt BURNUS – absolwent Wydziału Chemicznego Politechniki Krakowskiej. Asystent w Zakładzie Analiz Pionu Technologii Nafty Instytutu Nafty i Gazu w Krakowie. Specjalność: analityka produktów naftowych z wykorzystaniem chromatografii gazowej.