

Zygmunt Burnus

Instytut Nafty i Gazu

# Oznaczanie wolnych steroli roślinnych i zwierzęcych w estrach metylowych kwasów tłuszczowych z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej

Przedstawiono opracowaną metodę rozpoznawania typu surowca zastosowanego do produkcji estrów metylowych kwasów tłuszczowych FAME. Do tego celu przygotowano własną metodę oznaczania wolnych steroli roślinnych i zwierzęcych w FAME. Z uwagi na charakterystyczny profil sterolowy każdego tłuszczu, opracowana metodyka pozwala na identyfikację pochodzenia surowca roślinnego zastosowanego do produkcji FAME, jak również na wykrycie przypadków zastosowania surowca zwierzęcego.

Słowa kluczowe: biopaliwa, wolne sterole, chromatografia gazowa, estry metylowe kwasów tłuszczowych.

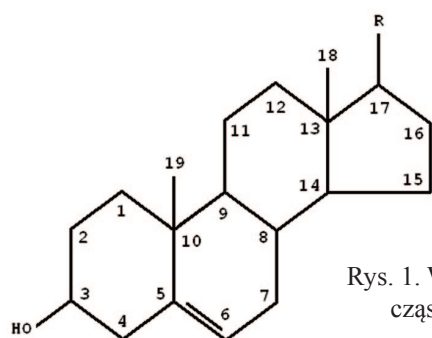
## Determination of free vegetable and animal sterols in fatty acid methyl esters using the gas chromatography technique

In this paper, the method of recognition of the type of raw material used for the production of fatty acid methyl esters FAME is presented. For this purpose, a method of determination of free sterols of animal and plant origin in FAME is used. Due to the characteristic sterol profile of each fat, the method developed in this work allows the identification of the origin of plant material used for the production of FAME, as well as detecting the use of animal material.

Key words: biofuels, free sterols, gas chromatography, fatty acid methyl esters.

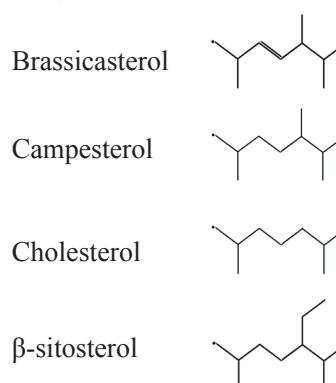
### Wstęp

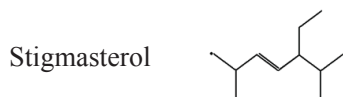
Sterole to grupa związków organicznych z grupy sterydów, charakteryzujących się układem czterech skoniugowanych pierścieni węglowych z przyłączoną grupą hydroksylową w pozycji 3. Budowę strukturalną cząsteczek steroli przedstawiono na rysunku 1 [6].



Rys. 1. Wzór strukturalny cząsteczek steroli

Cząsteczki steroli różnią się między sobą jedynie bocznym łańcuchem węglowym R. Budowę tego łańcucha dla najbardziej typowych steroli roślinnych i zwierzęcych przedstawiono na rysunku 2 [6].





Rys. 2. Wzór strukturalny łańcucha węglowego dla wybranych cząsteczek steroli

Jak pokazano na rysunku 2, na łańcuch węglowy w poszczególnych cząsteczkach steroli składa się od 9 atomów węgla (cholesterol) do 11 atomów węgla ( $\beta$ -sitosterol oraz stigmasterol). Spośród wymienionych powyżej steroli wiąza-

nie podwójne obecne jest jedynie w cząsteczce brassicasterolu oraz stigmasterolu. Wymienione różnice w budowie strukturalnej decydują o właściwościach fizykochemicznych steroli, a w szczególności o ich temperaturach wrzenia. Skutkują one zróżnicowanymi czasami retencji w procesie rozdzielania chromatograficznego. Spośród wybranych steroli najkrótszym czasem retencji charakteryzuje się cholesterol, z uwagi na najkrótszy łańcuch węglowy, a najdłuższym –  $\beta$ -sitosterol, ze względu na najdłuższy łańcuch węglowy i brak w nim wiązania podwójnego.

### Sterole roślinne i zwierzęce – występowanie

Sterole roślinne, zwane również fitosterolami, to jedna z wielu grup składników występujących w olejach roślinnych w ilościach śladowych. Są one obecne w postaci steroli wolnych lub związanych jako estry sterolowe. Wolne sterole są częściowo usuwane w procesie rafinacji olejów roślinnych, bez znaczących zmian w ich składzie. W procesie produkcji estrów metylowych kwasów tłuszczowych poprzez transestryfikację olejów roślinnych sterole pozostają w produkcie końcowym na wykrywalnym poziomie. Profil sterolowy oleju roślinnego podczas transestryfikacji praktycznie nie ulega zmianom, dzięki czemu możliwa jest identyfikacja typu surowca roślinnego, z którego wyprodukowano FAME.

Podobną informację zapewniają również oznaczenia według PN-EN ISO 5508 oraz PN-EN 14103, poprzez podanie informacji o składzie kwasów tłuszczowych, jednak metodyki opisane w tych normach posiadają słabe punkty. Podstawowym problemem jest fakt, że skład kwasów tłuszczowych nie jest stały dla danego oleju lub tłuszczu. Określa się jedynie granice zawartości dla poszczególnych kwasów tłuszczowych. A zatem w przypadku mieszania surowców roślinnych, szczególnie w przypadku niewielkich domieszek lub zanieczyszczeń, może nie być możliwe stwierdzenie typu surowca roślinnego, z uwagi na niewielkie, niezauważalne różnice, które mogą się pojawić wówczas w składzie kwasów tłuszczowych.

W przypadku zawartości steroli roślinnych sytuacja przedstawia się zupełnie inaczej. Każdy olej lub tłuszcz roślinny posiada charakterystyczny skład steroli o jedynie niewielkiej

zmienności, która zależna jest od pochodzenia. Znane są również sterole, które występują tylko w danym surowcu roślinnym. Dzięki temu możliwa jest identyfikacja zanieczyszczenia surowca roślinnego innym z dużą pewnością statystyczną.

Fakt ten jest wykorzystywany między innymi w przypadku wykrywania fałszerstw polegających na rozcieńczaniu wartościowych olejów roślinnych tańszymi olejami roślinnymi. Na przykład wykrycie fałszowania oliwy z oliwek olejem rzepakowym polega na zbadaniu obecności brassicasterolu, który poza rzepakiem występuje w znaczących ilościach jedynie w algach.

Oznaczenie steroli jest również odpowiednie w przypadku konieczności wykrywania zastosowania surowca zwierzęcego do produkcji FAME. Spośród całej grupy steroli tłuszcze zwierzęce zawierają głównie cholesterol, a jego zawartość w smalcu osiąga nawet 1000 ppm [6]. W olejach roślinnych cholesterol występuje jedynie w śladowych ilościach, tj. poniżej 50 ppm, co daje możliwość wykrycia dodatku tłuszczów zwierzęcych do olejów roślinnych [6].

Do wolnych steroli najczęściej występujących w roślinach należą:  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, campesterol i brassicasterol. Oznaczenie wymienionych steroli wraz ze sterolem zwierzęcym – cholesterolem wydaje się najbardziej uzasadnione podczas przeprowadzania badań porównawczych i identyfikacyjnych czystych estrów metylowych kwasów tłuszczowych FAME pochodzących z różnych źródeł.

### Właściwości fizykochemiczne steroli

Sterole roślinne i zwierzęce mają postać bezbarwnych kryształów i charakteryzują się wysokimi temperaturami topnienia, do 170°C w przypadku stigmasterolu [3]. Temperatury wrzenia wahają się w zakresie od 360°C dla cholesterolu do nawet 500°C dla sitosterolu.

Pomimo wysokich temperatur wrzenia omawianych struktur i dobrej rozpuszczalności w czystych estrach kwasów tłuszczo-

wych FAME, w obniżonych temperaturach sterole mogą ulegać krystalizacji z FAME lub z oleju napędowego zawierającego FAME, wraz z innymi składnikami posiadającymi wysokie temperatury krzepnięcia, takimi jak nasycone monoacyloglicerole i wolne glukozydy steroli. Proces ten prowadzi do powstawania osadów na dnie zbiorników z paliwem oraz na filtrach układu doprowadzenia paliwa do silnika z zapłonem

samoczynnym. W skrajnych przypadkach może to skutkować zatkaniem filtra paliwa i unieruchomieniem silnika.

Tang, Gunzman i Salley zbadali wpływ zróżnicowanego dodatku FAME do oleju napędowego na ilość powstających osadów [17, 18]. Badali również skład chemiczny osadów, stwierdzając w nich obecność wolnych steroli. Inni badacze z USA, w tym Moreau, Scott i Haas, również potwierdzili obecność tych struktur w powstających osadach [8].

Zawartość wolnych steroli nie jest ujęta w *Rozporządzeniu Ministra Gospodarki z dnia 22 stycznia 2009 r. w spra-*

*wie wymagań jakościowych dla biopaliw ciekłych* [15], jak również w *Rozporządzeniu Ministra Gospodarki z dnia 22 kwietnia 2010 r. w sprawie metod badania jakości biopaliw ciekłych* [16]. Badanie wymienionych struktur jest jednak uzasadnione z uwagi na możliwość pozyskania informacji o naturze substancji wytrącających się z paliwa w obniżonych temperaturach i powodujących problemy eksploatacyjne oraz o pochodzeniu produktu, jakim są estry metylowe kwasów tłuszczowych FAME, stosowane jako paliwo do silników z zapłonem samoczynnym.

### Metody oznaczania steroli roślinnych i zwierzęcych

W zbiorze Polskich Norm dostępne są obecnie trzy metodyki badania steroli w olejach i tłuszczach roślinnych oraz zwierzęcych.

Metodyka według PN-EN ISO 11702:2010 *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Enzymatyczne oznaczanie ogólnej zawartości steroli* [11] dotyczy oznaczania jedynie całkowitej zawartości steroli i nie daje możliwości zastosowania techniki chromatografii gazowej.

Pozostałe dwie metodyki, według PN-EN ISO 12228:2002 *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Oznaczanie poszczególnych steroli i ich całkowitej zawartości – Metoda chromatografii gazowej* [12] oraz PN-ISO 3594:2000 *Tłuszcz mleczny – Wykrywanie steroli tłuszczu roślinnego metodą chromatografii gazowej* [13], stosują technikę chromatografii gazowej oraz zawierają wyczerpujący opis sposobu przygotowania próbek.

Metodyka zawarta w normie PN-ISO 3594:2000 nie jest ilościowa i obejmuje jedynie przygotowanie digitonianów steroli, rozpuszczenie ich w mieszaninie formamidu i dimetyloformamidu, wyekstrahowanie frakcji steroli i rozdział metodą chromatografii gazowej. Metoda dotyczy jedynie jakościowego wykrywania olejów roślinnych w próbce poprzez sprawdzenie obecności piku  $\beta$ -sitosterolu i innych fitosteroli.

W tablicy 1 zestawiono warunki wykonania oznaczania poszczególnych steroli według normy PN-EN ISO 12228:2002 oraz przedstawione w wybranych pozycjach literaturowych.

Metodyka opisana w normie PN-EN ISO 12228:2002 polega na przygotowaniu próbki poprzez jej zmydlenie przy użyciu etanolowego roztworu wodorotlenku potasu, oddzieleniu frakcji steroli od estrów metylowych kwasów tłuszczowych na kolumnie z tlenkiem glinu, dodatkowym oczyszczeniu frakcji steroli za pomocą chromatografii cienkowarstwowej, a następnie użyciu techniki chromatografii gazowej z zastosowaniem kolumny kapilarnej z fazą stacjonarną typu SE-54 oraz detektora płomieniowo-jonizacyjnego. Do obliczeń ilościowych wykorzystano metodę wzorca wewnętrznego.

Jako wzorec wewnętrzny zastosowano betulinę. Poza stanolami, będącymi sterolami o nasyconych pierścieniach, wymienioną metodą można oznaczać szeroką gamę steroli: od cholesterolu do uvaolu.

Paavo Kalo i Tiia Kuuranne w swojej pracy [9] badali oleje i tłuszcze pod kątem zawartości wolnych i estryfikowanych steroli. W celu wydzielenia frakcji steroli wykorzystano technikę SPE, a następnie, dla wykrycia poszczególnych steroli, technikę chromatografii gazowej z detekcją mas. Autorzy pracy zastosowali technikę cieczowej chromatografii kolumnowej celem rozdzielania estrów sterolowych od wolnych steroli, a wydzielona frakcja wolnych steroli zawierała również pozostałości diacylogliceroli i triacylogliceroli, stąd celem ich rozłożenia poddano ją transestryfikacji. Z doświadczeń autora pracy w badaniach steroli w estrach metylowych kwasów tłuszczowych wynika, że nie jest to konieczne przy użyciu odpowiedniej kolumny chromatograficznej, z uwagi na znacznie różniące się czasy retencji dla wyżej wymienionych związków. Konieczne jest tylko przeprowadzenie steroli w pochodne silanowe – celem poprawienia ich wykrywania przez detektor płomieniowo-jonizacyjny. W innej pracy Anna Rocco i Salvatore Fanali [14] wykorzystali technikę chromatografii cieczowej nano-LC z detekcją UV oraz detekcją mas do oznaczania steroli w oliwie z oliwek. Zastosowano przygotowanie próbki obejmujące jej zmydlenie przy użyciu etanolowego roztworu KOH, ekstrakcję eterem dietylowym, odwirowanie i oczyszczenie metodą chromatografii cieczowej. Nie zastosowano w tym przypadku silanowania analitów w próbce, gdyż nie jest ono wymagane w przypadku chromatografii cieczowej.

Interesującą pozycją literaturową jest praca [10] Dutty C. Paresha i Lena Normena, w której szczegółowo opisano technikę oznaczania steroli roślinnych z zastosowaniem chromatografii gazowej. Wskazano na możliwość rozdzielania poszczególnych stanoli. Rozdział steroli od stanoli wymaga specjalnej kolumny chromatograficznej z fazą o niskiej średniej polarności DB-1701 (metylo 7% cjanopropyl 7%

Tablica 1. Zestawienie warunków chromatografii gazowej badania steroli według dostępnej metodyki znormalizowanej PN-EN ISO 12228:2002 na tle wybranych pozycji literaturowych

Warunki metody	Numer normy, tytuł pozycji literaturowej		
	PN-EN ISO 12228:2002, <i>Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Oznaczanie poszczególnych steroli i ich całkowitej zawartości – Metoda chromatografii gazowej</i> [12]	Paavo Kalo, Tiia Kuuranne, <i>Analysis of free and esterified sterols in fats and oils by flash chromatography, gas chromatography and electrospray tandem mass spectrometry</i> [9]	Marion Lechner, Birgit Reiter, Eberhard Lorbeer, <i>Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis</i> [7]
Zakres metody	nie podano	nie podano	nie podano
Granica oznaczalności	nie podano	nie podano	nie podano
Zakres wyznaczenia precyzji	dla próbek oliwy z oliwek, oleju słonecznikowego i rzepakowego	dla próbek oleju z orzechów, oleju słonecznikowego i rzepakowego	dla próbek oleju słonecznikowego, sojowego, rycynowego i rzepakowego
Dokładność	dla sumy steroli: 1 mg/kg, dla procentowej zawartości steroli: 0,1%	dla sumy steroli: 1 mg/kg oleju, dla procentowej zawartości steroli: 0,01%	dla sumy steroli: 1 mg/kg oleju, dla procentowej zawartości steroli: 0,01%
Powtarzalność względna (rzepak) [%]	dla sumy steroli: 6,44 dla cholesterolu: 55,0 dla brassicasterolu: 3,52 dla campesterolu: 1,44 dla stigmasterolu: 50,0 dla sitosterolu: 1,42	nie podano	dla sumy steroli: 2,2 dla brassicasterolu: 2,1 dla campesterolu: 2,3 dla stigmasterolu: 16,2 dla sitosterolu: 6,4
Odtwarzalność względna (rzepak) [%]	dla sumy steroli: 28,15 dla cholesterolu: 102,5 dla brassicasterolu: 6,67 dla campesterolu: 2,59 dla stigmasterolu: 96,7 dla sitosterolu: 4,63	nie podano	nie podano
Masa próbki [g]	250 mg	nie podano	20÷30 mg
Przygotowanie próbki	– zmydlenie przy użyciu etanolowego roztworu wodorotlenku potasu – oddzielenie frakcji steroli od estrów metylowych kwasów tłuszczowych na kolumnie z tlenkiem glinu – oczyszczenie frakcji steroli za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC – silanowanie steroli przy użyciu MSHFBA ( <i>N</i> -metyl- <i>N</i> -(trimetylsilyl)-heptafluorobutyramid)	– oddzielenie frakcji steroli od estrów metylowych kwasów tłuszczowych na kolumnie z żelalem krzemionkowym mesh 60 – zmydlenie przy użyciu metanolowego roztworu wodorotlenku sodu – silanowanie steroli przy użyciu <i>N</i> , <i>O</i> -bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamide)	– oddzielenie frakcji steroli od oleju przy użyciu techniki SPE – silanowanie steroli przy użyciu MSTFA w obecności pirydyny jako katalizatora
Dozownik	split, współczynnik podziału strumienia 1:20, temperatura 320°C	chłodzony powietrzem do bezpośredniego wprowadzania na kolumnę <i>cool on-column</i>	OCI, do bezpośredniego wprowadzania na kolumnę
Kolumna chromatograficzna	kolumna kapilarna (od 25 do 60 m) × (0,20÷0,25 mm) z fazą typu SE-54 o grubości filmu $df = 0,1 \mu\text{m}$	kolumna kapilarna 30 m × 0,25 mm z fazą typu DB-5 o grubości filmu $df = 0,25 \mu\text{m}$	kolumna kapilarna 15 m × 0,32 mm z fazą typu DB-17HT o grubości filmu $df = 0,15 \mu\text{m}$
Detektor	FID – płomieniowo-jonizacyjny, temperatura 320°C	FID – płomieniowo-jonizacyjny	FID – płomieniowo-jonizacyjny, temperatura 360°C
Objętość dozy	1 $\mu\text{l}$	nie podano	1 $\mu\text{l}$
Program temperaturowy termostatu	temperatura początkowa 240°C przyrost temperatury 4°C/min do 255°C	– izoterma początkowa 200°C (1 minuta) – przyrost temperatury 10°C/min do 285°C (1 minuta) – przyrost temperatury 0,5°C/min do 295°C – przyrost temperatury 5°C/min do 320°C (10 minut)	– temperatura początkowa 70°C – przyrost temperatury 15°C/min do 230°C – przyrost temperatury 5°C/min do 250°C – przyrost temperatury 25°C/min do 350°C (3 minuty)
Czas analizy GC	45 minut	30 minut	30 minut



fenylopolisiloksan). Według autorów taki rozdział nie jest możliwy przy zastosowaniu najczęściej używanej w laboratoriach kolumny kapilarnej o niskiej polarności. Stanole występują jednak w znaczących ilościach tylko w tłuszczach pochodzących z ziaren zbóż, stąd nie ma konieczności zapewnienia ich rozdziału od steroli. Potwierdzeniem bardzo niskich poziomów stanoli w typowych olejach roślinnych jest chromatogram podany w normie PN-EN ISO 12228:2002, na którym stanole stanowią jedynie piki śladowe, wydzielone za pikami właściwych steroli, będące na granicy szumu linii bazowej. Interesujący jest fakt, że wbrew zapisom w pozycji literaturowej [10] w omawianej normie zastosowano kolumnę o niskiej polarności z fazą SE-54 (metylo 5% fenylopolisiloksan), uzyskując pełny rozdział steroli od stanoli. Dodatkowo w artykule przeglądowym [1], dotyczącym oznaczania steroli przy użyciu różnych technik, S. L. Abidi opisuje możliwość zastosowania faz stacjonarnych o niskiej polarności. W pracy Marion Lechner, Birgit Reiter i Eberharda Lorbeera [7] zaprezentowano możliwość zastąpienia etapu zmydlenia próbki i przygotowania jej poprzez rozdział przy użyciu chromatografii cieczowej, poprzez technikę SPE – ekstrakcję do fazy stałej.

### Część doświadczalna

W niniejszej pracy opracowano własną metodę oznaczania steroli roślinnych i zwierzęcych w estrach metylowych kwasów tłuszczowych FAME. Do oznaczania zostały wybrane sterole najczęściej występujące w roślinach: brassicasterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol i stigmasterol oraz sterol pochodzenia zwierzęcego – cholesterol. Praca została wykonana przy użyciu chromatografu gazowego firmy Thermo Electron Corporation model TRACE GC Ultra. Wykonano próby wstępne przy użyciu zakupionej mieszaniny steroli roślinnych (*Plant Sterol Mixture*,  $\beta$ -sitosterol 53%, stigmasterol 7%, campesterol 26%, brassicasterol 13%, dostawca: Larodan, Szwecja). Po wyborze najbardziej optymalnego czynnika silanującego (MSTFA – *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, dostawca: Sigma-Aldrich) i po przeprowadzeniu wzorcowych steroli w pochodne silanowane w obecności pirydyny (pirydyna odwodniona, dostawca: Sigma-Aldrich) otrzymaną mieszaninę wzorcową dozowano do chromatografu gazowego i zoptymalizowano program temperaturowy termostatu dla zakupionej kolumny chromatograficznej Supelco z fazą SPB-5.

Po wykonaniu wielu badań stwierdzono, że najbardziej optymalnym programem temperaturowym dla opracowanej własnej metody oznaczania steroli w FAME jest praca w warunkach programowanego przyrostu temperatury od 100°C z przyrostem temperatury 15°C/min do maksymalnej temperatury pracy kolumny. Konieczne było również

Biorąc pod uwagę powyższe wnioski, autor skupił się na opracowaniu możliwie najszybszej metody oznaczania steroli w estrach metylowych kwasów tłuszczowych, z preferowanym wykorzystaniem szeroko dostępnych kolumn kapilarnych do chromatografii gazowej. Wstępne próby potwierdziły możliwość zastosowania kolumny kapilarnej z fazą o niskiej polarności typu metylopolisiloksan do rozdziału poszczególnych steroli w FAME. Spośród dostępnych układów wprowadzania próbki zdecydowano się na dozownik *cool on-column*, zapewniający najwyższą czułość i eliminację możliwej degradacji termicznej analitów. Jako kolumnę kapilarną zdecydowano się zastosować kolumnę Supelco o długości 15 m i średnicy wewnętrznej 0,32 mm z fazą SPB-5 (metylo 5% fenylopolisiloksan) o grubości filmu 0,25  $\mu$ m. Wymieniona kolumna zapewnia bardzo dobry rozdział pomiędzy wybranymi sterolami – do linii bazowej, jak również rozdział od pozostałych składników FAME: monoacylogliceroli, diacylogliceroli i triacylogliceroli oraz między innymi tokoferoli, glikozydów steroli i estrów sterolowych. Po przeprowadzeniu badań stwierdzono, że nie jest konieczne wydzielanie frakcji sterolowej z FAME, ponieważ nie zachodzi nakładanie się pików z pozostałymi składnikami FAME.

zastosowanie programowanego przyrostu ciśnienia gazu nośnego, szczególnie przy analizie struktur o wysokiej masie cząsteczkowej (dla  $\beta$ -sitosterolu  $M_{cz} = 414$ ) na kolumnie z filmem fazy stacjonarnej o grubości 0,25  $\mu$ m. Całkowity czas analizy wyniósł 24,3 minuty, przy uzyskaniu bardzo dobrego rozdziału pomiędzy pikami steroli roślinnych i zwierzęcych. Sterole zostały także rozdzielone od pozostałych składników FAME, a w warunkach metody z kolumny eluowane są również resztkowe triacyloglicerole z FAME.

Dodatkowo w niniejszej pracy sprawdzono cząstkową informację zawartą w normie PN-EN ISO 12228:2002 o zbliżonych wartościach współczynników odpowiedzi detektora płomieniowo-jonizacyjnego FID w pewnych warunkach dla wzorca wewnętrznego – betuliny i pozostałych steroli. Wyznaczono również krzywe wzorcowe dla steroli różniących się długością podstawnika względem wzorca – betuliny.

Oznaczenia w niniejszej pracy wykonano na chromatografie gazowym TRACE GC Ultra firmy Thermo Electron Corporation. Na jego wyposażenie składały się następujące elementy:

- dozownik z bezpośrednim dozowaniem na kolumnę *cool on-column*;
- kolumna chromatograficzna SPB-5 (metylo 5% fenylopolisiloksan) o wymiarach: 15 m  $\times$  0,32 mm, z filmem fazy stacjonarnej o grubości 0,25  $\mu$ m, firmy Supelco, USA;

- przedkolumna *Guard column*, 0,4 m × 0,53 mm, dezaktywowana, połączona z kolumną analityczną przy użyciu łącznika uniwersalnego do kolumn kapilarnych *Universal Fused Silica Press-Tight Connector* – Restek Corporation;
- detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID);
- program *Chrom-Card for USB* do integracji i obróbki chromatogramów, firmy Thermo Electron Corporation. Do badań dobrano następujące warunki pracy chromatografu gazowego:
  - program temperaturowy termostatu:
    - izoterma początkowa: 100°C przez 1 minutę,
    - przyrost temperatury: 15°C/min, do 345°C,
  - izoterma końcowa: 345°C przez 7 minut,
  - czas trwania analizy: 24,3 minuty;
- ciśnienie gazu nośnego programowane:
  - izobara początkowa: 100 kPa przez 1 minutę,
  - przyrost ciśnienia: 15 kPa/min, do 200 kPa,
  - izobara końcowa: 200 kPa przez 5 minut;
- dozownik z bezpośrednim dozowaniem na kolumnę *cool on-column* chłodzony powietrzem;
- objętość dozy: 1 µl;
- temperatura detektora płomieniowo-jonizacyjnego FID: 370°C;
- natężenie przepływu wodoru i powietrza do detektora: według instrukcji chromatografu.

### Przygotowanie wzorców i próbek przed analizą GC

Przed analizą chromatograficzną analizowaną próbkę lub roztwór wzorcowy poddano reakcji silanowania celem poprawy wykrywalności steroli poprzez obniżenie polarności ich grup wodorotlenowych, ułatwiając w ten sposób eluowanie z kolumny chromatograficznej z fazą stacjonarną o niskiej polarności.

Odpowiednią objętość próbki (0,100 ml) lub roztworu wzorcowego (od 0,002 ml do 0,100 ml) wprowadzono przy użyciu mikrostrzykawkki do fiołki o pojemności 1,5 ml. Do

fiołki dodano 0,100 ml MSTFA i 0,100 ml pirydyny oraz 0,100 ml roztworu wzorca wewnętrznego przygotowanego metodą podaną w tekście. Fiołkę zakapslowano, następnie wytrząsano przez 3 minuty i odstawiono na 15 minut. Po tym czasie zawartość fiołki przeniesiono ilościowo do próbki o pojemności 20 ml przy użyciu 8 ml n-heptanu, odmierzonego z zastosowaniem cylindra pomiarowego o pojemności 10 ml. Tak przygotowany roztwór dozowano do chromatografu gazowego.

### Wyznaczenie czasów retencji dla steroli roślinnych i zwierzęcych

Celem prawidłowej identyfikacji wymienionych steroli roślinnych i zwierzęcych wytypowanych do oznaczania sporządzono roztwory jakościowe każdego z oznaczanych steroli (cholesterol, stigmasterol, β-sitosterol, dostarczone przez firmę Sigma-Aldrich, oraz campesterol, dostarczony przez Larodan, Szwecja), a także mieszaniny wzorcowej steroli (dla wyznaczenia czasu retencji brassicasterolu) w pirydynie oraz wzorca wewnętrznego – betuliny (dostarczonej przez Sigma-Aldrich) – wszystkie roztwory na poziomie 0,2 mg/ml.

Z każdego z roztworów pobrano po 50 µl do osobnych fiołek o pojemności 1,5 ml, do których dodano po 100 µl MSTFA i 100 µl pirydyny. Po wytrząsaniu przez 3 minuty i odstawieniu na 15 minut każdy z roztworów przeniesiono ilościowo do próbek o pojemności 20 ml przy użyciu 8 ml n-heptanu odmierzonego z zastosowaniem cylindra pomiarowego o pojemności 10 ml, po czym każdy z roztworów analizowano.

Zidentyfikowano czasy retencji steroli i wzorca wewnętrznego – betuliny. Czasy retencji otrzymane dla steroli, w kolejności ich eluowania z kolumny GC, zostały przedstawione w tabelicy 2 wraz z względnymi czasami retencji w odniesieniu do wzorca wewnętrznego – betuliny.

Tabela 2. Czasy retencji uzyskane dla poszczególnych steroli oraz dla wzorca wewnętrznego – betuliny

Sterole i wzorzec wewnętrzny	Wyznaczony czas retencji [min]	Względny czas retencji
Cholesterol	11,6	0,872
Brassicasterol	11,8	0,887
Campesterol	12,1	0,910
Stigmasterol	12,2	0,917
β-sitosterol	12,4	0,932
Betulina – wzorzec wewnętrzny	13,3	1,000

### Wyznaczenie krzywych wzorcowych dla wybranych steroli

Celem sprawdzenia stałości współczynnika odpowiedzi detektora płomieniowo-jonizacyjnego FID dla steroli wzglę-

dem wzorca wewnętrznego – betuliny, wykonano krzywe wzorcowe dla dostępnych wzorców steroli, różniących się

między sobą pod względem budowy strukturalnej, o najwyższej dostępnej czystości: cholesterolu i stigmasterolu. Sporządzono roztwór wzorcowy cholesterolu, stigmasterolu oraz roztwór wzorca wewnętrznego – betuliny, wszystkie o stężeniu około 6 mg/ml.

Odmierzając do osobnych fiolek przy użyciu mikrostrzykawek odpowiednie objętości roztworów podstawowych cholesterolu i stigmasterolu oraz wzorca wewnętrznego betuliny w stałej ilości, uzyskano roztwory o stężeniu oznaczanych substancji w zakresie od 0,010% (m/m) do 0,581% (m/m). W kolejnym etapie postępowano zgodnie z podaną wcześniej procedurą przygotowania próbek do analizy. Z tak sporządzonych wzorców w fiolkach do GC pobierano każdorazowo po 1 µl i dozowano do chromatografu gazowego.

Celem wykreślenia krzywych wzorcowych zależności sygnału od stężenia cholesterolu i stigmasterolu względem wzorca betuliny wyznaczono wartości średnie powierzchni pików dwóch badanych steroli i betuliny dla analizowanych roztworów wzorcowych. Obliczono iloraz mas sterolu i betuliny dla każdego roztworu wzorcowego. Otrzymane wartości przedstawiono w tablicach 3 i 4.

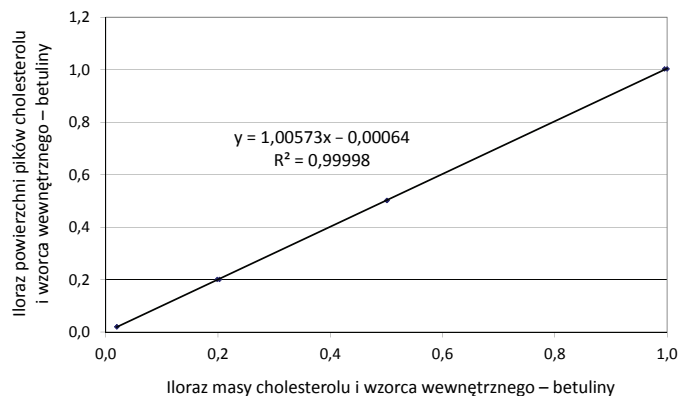
Tablica 3. Dane uzyskane podczas wyznaczania krzywej regresji cholesterolu

Iloraz masy cholesterolu i wzorca wewnętrznego – betuliny	Średnia powierzchnia pików cholesterolu	Średnia powierzchnia pików wzorca wewnętrznego – betuliny
0,020	150 815	7 656 602
0,201	1 587 535	7 919 425
0,502	3 896 858	7 781 658
1,003	7 730 844	7 749 355

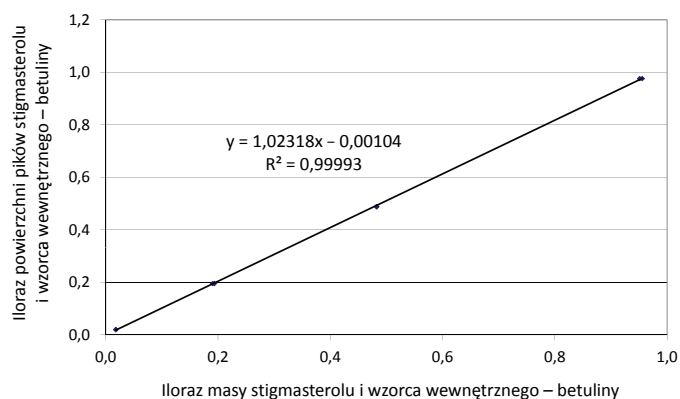
Tablica 4. Dane uzyskane podczas wyznaczania krzywej regresji stigmasterolu

Iloraz masy stigmasterolu i wzorca wewnętrznego – betuliny	Średnia powierzchnia pików stigmasterolu	Średnia powierzchnia pików wzorca wewnętrznego – betuliny
0,020	137 112	7 656 602
0,195	1 520 079	7 919 425
0,488	3 754 059	7 781 658
0,976	7 386 423	7 749 355

Dla każdego z punktów krzywej wzorcowej obliczono iloraz powierzchni pików cholesterolu/stigmasterolu i betuliny, po czym wykreślono krzywe wzorcowe zależności ilorazu mas sterolu i wzorca wewnętrznego od ilorazu ich powierzchni. Otrzymane krzywe wzorcowe przedstawiono na rysunkach 3 i 4.



Rys. 3. Krzywa wzorcowa oznaczania cholesterolu w FAME



Rys. 4. Krzywa wzorcowa oznaczania stigmasterolu w FAME

Analizując powyższe krzywe regresji wraz z podanymi równaniami liniowymi w warunkach metody, stwierdzono różnicę pomiędzy współczynnikami kierunkowymi dla cholesterolu i stigmasterolu wynoszącą 1,7% względnych. Nie jest zatem zalecane stosowanie tego samego współczynnika odpowiedzi dla steroli i betuliny, pomimo takiego zapisu w normie PN-EN ISO 12228:2002. Przy bardzo niskich wartościach współczynnika przesunięcia (na poziomie -0,001) zaobserwowanych dla obu krzywych wzorcowych możliwe jest jednak ich pominięcie i zastosowanie współczynników wzorcowania dla poszczególnych steroli. Zastosowano zatem zróżnicowane współczynniki wzorcowania  $K_s$  dla poszczególnych steroli w zależności od długości podstawnika. W przypadku cholesterolu (podstawnik  $C_9$ ) współczynnik wzorcowania  $K_s$  przyjmuje wartość współczynnika kierunkowego krzywej wzorcowej. Dla stigmasterolu i sitosterolu (podstawnik  $C_{11}$ ) możliwe jest zastosowanie jednego współczynnika wzorcowania  $K_s$ , ponieważ stanowią one izomery strukturalne. Brassicasterol i campesterol (podstawnik  $C_{10}$ ) – również izomery strukturalne – posiadają długość podstawnika pomiędzy cholesterolem a stigmasterolem/sitosterolem, a zatem przyjęto dla nich średni współczynnik wzorcowania  $K_s$  ze współczynników wzorcowania wyznaczonych dla powyższych steroli. Wyznaczone współczynniki wzorcowania  $K_s$  dla steroli roślinnych i zwierzęcych przedstawiono w tablicy 5.

Tablica 5. Wartości współczynników wzorcowania  $K_s$  dla oznaczanych steroli

Nazwa sterolu	Współczynnik odpowiedzi względem betuliny, $K_s$
Cholesterol	1,006
Brassicasterol	1,015
Campesterol	1,015
Stigmasterol	1,023
$\beta$ -sitosterol	1,023

Podsumowując, w dalszych badaniach zastosowano metodę wzorcowania z wzorcem wewnętrznym z bezpośrednim odniesieniem do jego naważki, bez konieczności wyznaczania krzywych wzorcowych dla poszczególnych steroli. Dodatko-

wo przy użyciu roztworów wzorcowych wykazano liniowość odpowiedzi detektora FID dla oznaczania zawartości steroli w zakresie od 0,010% ( $m/m$ ) do 0,581% ( $m/m$ ).

Zawartość poszczególnych steroli  $C_s$  obliczono każdorazowo według poniższego wzoru:

$$C_s = (A_s/A_{IS}) \cdot (m_{IS}/m) \cdot K_s \cdot 100\% \quad (1)$$

gdzie:

$A_s$  – powierzchnia pików zidentyfikowanego sterolu,

$A_{IS}$  – powierzchnia pików wzorca wewnętrznego – betuliny,

$m_{IS}$  – masa wzorca wewnętrznego dodanego do próbki,

$m$  – masa próbki

$K_s$  – współczynnik wzorcowania sterolu względem betuliny (tablica 5).

### Powtarzalność metody oznaczania steroli roślinnych w estrach metylowych kwasów tłuszczowych FAME

Celem wyznaczenia powtarzalności metody wykonano od pięciu do siedmiu oznaczeń dla dostępnych próbek FAME zawierających sterole roślinne w zakresie 0,001÷0,186% ( $m/m$ ).

Obliczono odchylenie standardowe dla wartości średniej, następnie obliczono powtarzalność zgodnie z normą ASTM E 691 [2] według wzoru:

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

gdzie:  $s$  – odchylenie standardowe.

Uzyskane wyniki przedstawiono w tablicach 6 i 7.

Celem sprawdzenia, czy zachodzi zależność liniowa pomiędzy zawartością steroli a powtarzalnością ich oznaczania

Tablica 6. Wyznaczenie powtarzalności metody oznaczania steroli w estrach metylowych kwasów tłuszczowych FAME, próbka FAME z oleju sojowego

Próbka FAME z oleju sojowego									
Zawartość [% ( $m/m$ )]	Powtórzenia					Odchylenie standardowe $s$	ASTM E 691 $r$	Średnia	Powtarzalność [%]
	1	2	3	4	5				
Brassicasterol	< 0,011	< 0,011	< 0,011	< 0,011	< 0,011	–	–	–	–
Campesterol	0,061	0,060	0,062	0,061	0,060	0,0005	0,0014	<b>0,061</b>	<b>2,29</b>
Stigmasterol	0,055	0,056	0,057	0,055	0,055	0,0008	0,0024	<b>0,056</b>	<b>4,22</b>
$\beta$ -sitosterol	0,134	0,132	0,133	0,133	0,133	0,0009	0,0025	<b>0,133</b>	<b>1,86</b>
SUMA	0,250	0,247	0,252	0,249	0,249	0,0015	0,0043	<b>0,249</b>	<b>1,71</b>

Tablica 7. Wyznaczenie powtarzalności metody oznaczania steroli w estrach metylowych kwasów tłuszczowych FAME, próbka FAME z oleju rzepakowego

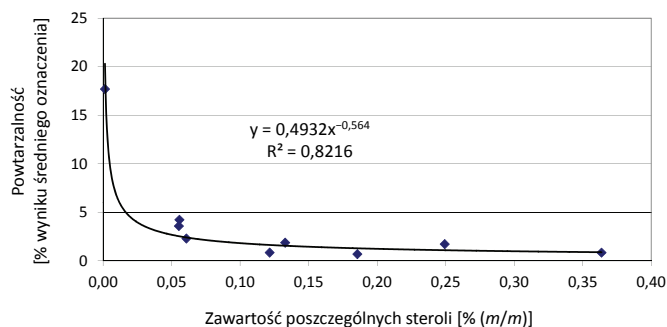
Próbka FAME z oleju rzepakowego											
Zawartość [% ( $m/m$ )]	Powtórzenia							Odchylenie standardowe $s$	ASTM E 691 $r$	Średnia	Powtarzalność [%]
	1	2	3	4	5	6	7				
Brassicasterol	0,054	0,055	0,055	0,056	0,055	0,056	0,056	0,0007	0,0020	<b>0,055</b>	<b>3,57</b>
Campesterol	0,121	0,122	0,122	0,122	0,121	0,122	0,122	0,0004	0,0010	<b>0,122</b>	<b>0,84</b>
Stigmasterol	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,0001	0,0002	<b>0,001</b>	<b>17,70</b>
$\beta$ -sitosterol	0,186	0,186	0,186	0,185	0,185	0,186	0,186	0,0005	0,0013	<b>0,186</b>	<b>0,68</b>
SUMA	0,362	0,363	0,364	0,363	0,363	0,365	0,365	0,0011	0,0030	<b>0,364</b>	<b>0,83</b>



nia, uszeregowano w porządku rosnącym dane zawartości poszczególnych steroli wraz z wyznaczoną powtarzalnością względną wyrażoną w procentach, a otrzymane wartości przedstawiono na wykresie (rysunek 5).

Nie zachodzi zależność liniowa wyznaczonej powtarzalności od stężenia steroli w FAME, zaobserwowano jednak zależność potęgową, która z dobrym przybliżeniem ( $R^2 = 0,8216$ ) opisuje wyznaczoną powtarzalność. Korelacja liniowa zachodzi pomiędzy logarytmem zawartości steroli a logarytmem powtarzalności. Z uwagi na wyznaczenie liniowości detektora płomieniowo-jonizacyjnego dla oznaczania steroli w FAME w zakresie od 0,011% (m/m) do 0,581% (m/m) – zakres metody ustalono na ten przedział, dolną granicę oznaczalności określono na 0,011% (m/m).

Zakres wyznaczenia powtarzalności wyniósł od 0,001% (m/m) do 0,364% (m/m).



Rys. 5. Wykres zależności wyznaczonej powtarzalności od zawartości poszczególnych steroli

### Sprawdzenie odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej dla metody oznaczania steroli w estrach metylowych kwasów tłuszczowych FAME

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną wdrażanej metody sprawdzono poprzez ponowne wykonanie po upływie tygodnia analizy próbki zawierającej sterole roślinne.

Obliczono bezwzględną różnicę pomiędzy poszczególnymi wynikami. Jako wartość referencyjną zastosowano powtarzalność wyznaczoną w niniejszej pracy obliczoną dla wartości średniej.

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelicy 8.

Żaden z wyników oznaczania steroli w FAME po upływie tygodnia nie różnił się od wyniku początkowego, w granicach wyznaczonej powtarzalności. W ten sposób, dzięki uzyskaniu każdorazowo bardzo dobrej odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej dla opracowanej procedury, można wnioskować o stabilności metody.

Tablica 8. Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna, wyniki oznaczeń steroli dla próbki 44/11 po upływie tygodnia

Sterole	Wyniki otrzymane w INiG [% (m/m)]	Wyniki otrzymane po upływie tygodnia w INiG [% (m/m)]	Bezwzględna różnica pomiędzy wynikami [% (m/m)]	Powtarzalność metody obliczona dla wartości średniej [% (m/m)]
Brassicasterol	<b>0,055</b>	<b>0,056</b>	0,001	0,001
Campesterol	<b>0,121</b>	<b>0,122</b>	0,001	0,002
Stigmasterol	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	0,000	0,000
$\beta$ -sitosterol	<b>0,185</b>	<b>0,186</b>	0,001	0,002
SUMA	<b>0,363</b>	<b>0,365</b>	0,002	0,003

### Wyznaczenie granicy wykrywalności i oznaczalności steroli

Granica wykrywalności stanowi najmniejszą możliwą do zmierzenia zawartość składnika próbki, na podstawie której wnioskuje się o obecności tego składnika z wystarczającą pewnością statystyczną. Granica wykrywalności odpowiada ilościowo odchyleniu standardowemu  $s_p$  średniej z serii oznaczeń ślepej próby pomnożonemu przez 3.

$$LOD \text{ (limit of detection)} = 3 \cdot s_p$$

Stąd wyznaczona granica wykrywalności dla steroli wynosi:

$$LOD_{\text{Sterole}} = 3 \cdot 0,0002 = 0,0006\% \text{ (m/m)}$$

Granica oznaczalności stanowi najniższą mierzalną zawartość składnika próbki, przy której można oznaczyć ilościowo ten składnik z odpowiednią pewnością statystyczną. Granica oznaczalności ilościowo odpowiada odchyleniu standardowemu  $s_p$  średniej z serii oznaczeń ślepej próby pomnożonemu przez 6.

$$LOQ \text{ (limit of quantification)} = 6 \cdot s_p$$

Stąd wyznaczona granica oznaczalności dla steroli wynosi:

$$LOQ_{\text{PUFA}} = 6 \cdot 0,0002 = 0,001\% \text{ (m/m)}$$

## Niepewność złożona metody oznaczania steroli w estrach metylowych kwasów tłuszczowych FAME

Niepewność stanowi obecnie parametr wyznaczany standardowo dla każdej nowo opracowywanej metody badawczej. Parametr ten daje pogląd na ostateczną precyzję uzyskiwanych wyników oznaczeń. Poprzez zbadanie wszystkich czynników mających wpływ na wynik końcowy oznaczenia możliwe jest podanie szerokości przedziału wokół końcowego wyniku oznaczenia, w którym z określonym prawdopodobieństwem – zwykle 95% – znajdzie się rzeczywisty wynik oznaczenia.

W pierwszym etapie szacowania niepewności określono wszystkie czynniki wpływające na niepewność metody oznaczania steroli w estrach metylowych kwasów tłuszczowych FAME.

Zastosowano następujące materiały wzorcowe, których czystość miała wpływ na niepewność wyniku końcowego oznaczania steroli:

- Betulina, firmy Sigma-Aldrich, o czystości deklarowanej 98,0% (*m/m*),  $(98,0 \pm 2,0)\%$  (*m/m*); rozkład prostokątny  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(P_1) = 1,155\%$  (*m/m*);
- Campesterol, firmy Larodan, o czystości deklarowanej 98,0% (*m/m*),  $(98,0 \pm 2,0)\%$  (*m/m*); rozkład prostokątny  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(P_2) = 1,155\%$  (*m/m*);
- Cholesterol, firmy Sigma-Aldrich, o czystości deklarowanej 99,0% (*m/m*),  $(99,0 \pm 1,0)\%$  (*m/m*); rozkład prostokątny  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(P_3) = 0,577\%$  (*m/m*);
- Stigmasterol, firmy Sigma-Aldrich, o czystości deklarowanej 96,5% (*m/m*),  $(96,5 \pm 3,5)\%$  (*m/m*); rozkład prostokątny  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(P_4) = 2,021\%$  (*m/m*).

Na niepewność sporządzenia roztworu wzorca wewnętrznego składają się poniższe niepewności standardowe:

- naważka około 0,060 g betuliny; dokładność ważenia 0,0001 g; rozkład prostokątny  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(m_1) = 0,0000577$  g;
- odmierzenie 10 ml pirydyny przy użyciu kolby pomiarowej; dokładność pomiaru 0,025 ml; rozkład prostokątny,  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(V_1) = 0,0144$  ml.

Na wyznaczenie współczynników wzorcowania steroli składają się następujące niepewności standardowe:

- naważka około 0,060 g cholesterolu, dokładność ważenia 0,0001 g; rozkład prostokątny  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(m_2) = 0,0000577$  g;
- naważka około 0,060 g stigmasterolu, dokładność ważenia 0,0001 g; rozkład prostokątny  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(m_3) = 0,0000577$  g;
- odmierzenie 10 ml pirydyny przy użyciu kolby pomiarowej; dokładność pomiaru 0,025 ml; rozkład prostokątny  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(V_2) = 0,0144$  ml;
- odmierzenie 0,100 ml roztworu wzorca wewnętrznego przy użyciu mikrostrzykawki o pojemności 0,100 ml;

dokładność pomiaru 0,001 ml; rozkład prostokątny  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(V_3) = 0,000577$  ml;

- odmierzenie 0,002 ml roztworu cholesterolu/stigmasterolu przy użyciu mikrostrzykawki o pojemności 0,010 ml; dokładność pomiaru 0,0002 ml; rozkład prostokątny  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(V_4) = 0,000115$  ml;
- odmierzenie 0,02 ml roztworu cholesterolu/stigmasterolu przy użyciu mikrostrzykawki o pojemności 0,050 ml; dokładność pomiaru 0,001 ml; rozkład prostokątny  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(V_5) = 0,000577$  ml;
- odmierzenie 0,05 ml roztworu cholesterolu/stigmasterolu przy użyciu mikrostrzykawki o pojemności 0,100 ml; dokładność pomiaru 0,001 ml; rozkład prostokątny  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(V_6) = 0,000577$  ml;
- odmierzenie 0,100 ml roztworu cholesterolu/stigmasterolu przy użyciu mikrostrzykawki o pojemności 0,100 ml; dokładność pomiaru 0,001 ml; rozkład prostokątny  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(V_7) = 0,000577$  ml.

Na niepewność związaną z przygotowaniem próbki na oznaczenie zawartości steroli składają się następujące niepewności standardowe:

- naważka około 0,100 g próbki; dokładność ważenia 0,0001 g; rozkład prostokątny  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(m_4) = 0,000058$  g;
- odmierzenie 0,100 ml roztworu wzorca wewnętrznego przy użyciu mikrostrzykawki o pojemności 0,100 ml; dokładność pomiaru 0,001 ml; rozkład prostokątny,  $u(c) = a/\sqrt{3}$ ,  $u(V_8) = 0,000577$  ml.

Niepewność związaną z powtarzalnością oznaczeń wyznaczono na podstawie wyników określenia powtarzalności dla badanych próbek. Najwyższa obliczona wartość odchylenia standardowego powtarzalności w zakresie pomiarowym wyniosła 0,0008% (*m/m*) dla zawartości steroli 0,0560% (*m/m*), a zatem niepewność względna przyjmie wartość  $u_w(r) = (0,0008/0,0560) \cdot 100\% = 1,43\%$  wyniku pomiaru. Dzięki zastosowaniu metody wzorca wewnętrznego niepewność związana z dokładnością mikrostrzykawki podczas dozowania nie ma wpływu na wynik końcowy.

W przypadku niepewności związanej z odczytem powierzchni pików steroli dokładność odczytu jest równa jednostce pomiaru powierzchni. Niepewność pomiaru wynosi w tym przypadku  $u(D) = 1/\sqrt{3}$ . Najniższa wartość odczytywanej powierzchni pików steroli w zakresie pomiarowym wynosi 135 000 jednostek, stąd niepewność cząstkowa wynosi 0,0004%. Wartość niepewności cząstkowej związanej z odczytem powierzchni pików wzorca wewnętrznego, wynoszącej 7 800 000 jednostek, stanowi 0,000007% niepewności, stąd obydwie wartości są do pominięcia w niepewności złożonej.

### Równanie pomiaru i niepewność złożona oznaczania steroli

Równanie pomiaru dla oznaczania steroli można zapisać w następujący sposób:

$$C_s = A_s \cdot M_s \cdot K_s \quad (3)$$

gdzie:

$C_s$  – zawartość oznaczanego sterolu w próbce FAME [% (m/m)],

$A_s$  – iloraz powierzchni pików oznaczanego sterolu i pola powierzchni pików wzorca wewnętrznego betuliny,

$M_s$  – iloraz masy wzorca wewnętrznego oraz masy próbki FAME,

$K_s$  – współczynnik wzorcowania dla oznaczanego sterolu względem wzorca wewnętrznego betuliny.

Niepewność wyznaczenia powierzchni pików sterolu i powierzchni pików wzorca wewnętrznego, a zatem i czynnika  $A_s$ , będącego ich ilorzem, jest do pominięcia w niepewności złożonej.

Na niepewność wyznaczenia czynnika  $M_s$  składają się niepewności związane z ważeniem próbek, pomiarami objętości oraz z czystością substancji wzorcowych:

$$u(M_s) = \sqrt{u_w^2(m) + u_w^2(V) + u_w^2(P)} \quad (4)$$

gdzie:

$u_w(m)$  – niepewność względna związana z pomiarami masy,

$u_w(V)$  – niepewność względna związana z pomiarami objętości,

$u_w(P)$  – niepewność względna związana z czystością materiałów wzorcowych.

Natomiast na niepewność wyznaczenia współczynnika  $K_s$  składają się niepewności związane z ważeniem

materiałów wzorcowych, pomiarami objętości roztworów wzorcowych oraz z czystością substancji wzorcowych. Te źródła niepewności mogą być włączone do podanego wcześniej równania (4).

Powyższe niepewności określa się za pomocą wzorów:

$$u_w(m) = \sum_{i=1}^2 \frac{u(m_i)}{m_i} \quad (5)$$

$$u_w(V) = \sum_{i=1}^2 \frac{u(V_i)}{V_i} \quad (6)$$

$$u_w(P) = \sum_{i=1}^6 \frac{u(P_i)}{P_i} \quad (7)$$

Równanie wyrażające niepewność oznaczania steroli w estrach metylowych kwasów tłuszczowych, po uwzględnieniu niepewności związanej z powtarzalnością  $u_w(r)$ , przyjmie ostatecznie postać:

$$u(C_s) = C_s \sqrt{\left[ \sum_{i=1}^4 \frac{u^2(m_i)}{m_i^2} \right] + \left[ \sum_{i=1}^8 \frac{u^2(V_i)}{V_i^2} \right] + \left[ \sum_{i=1}^4 \frac{u^2(P_i)}{P_i^2} \right] + u_w^2(r)} \quad (8)$$

Po podstawieniu wszystkich niepewności cząstkowych do wzoru (8) uzyskano wartość niepewności złożonej oznaczania steroli w estrach metylowych kwasów tłuszczowych:  $u(C_s) = C_s \cdot 0,07$ .

Niepewność rozszerzona przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia równego 2 dla poziomu ufności 95% wyniesie:  $U(C_s) = C_s \cdot 2 \cdot 0,07 = C_s \cdot 0,14$ .

### Wykonanie oznaczeń zawartości steroli w próbkach FAME

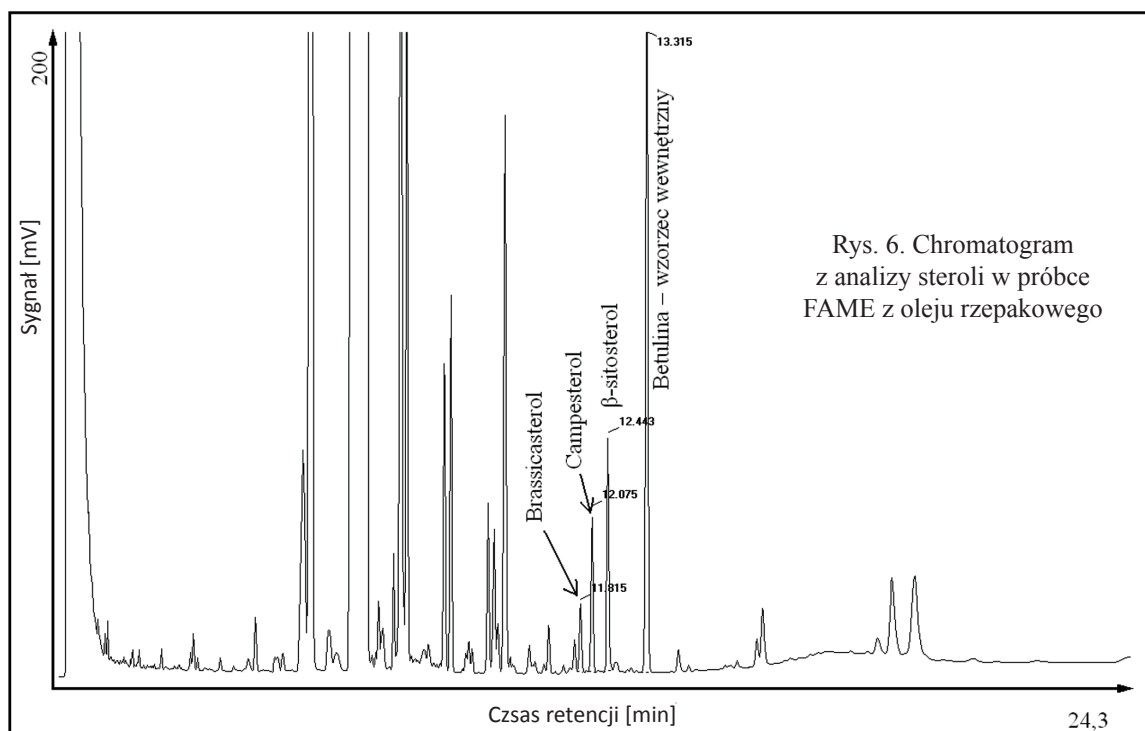
W pierwszej kolejności poddano badaniom próbki wzorcowe FAME znanego pochodzenia, celem oznaczenia w nich zawartości steroli. Próbki doprowadzono do temperatury pokojowej, później dokładnie wymieszano, a następnie naważono po 100 mg do osobnych fiolek, po czym postępowano zgodnie z procedurą przygotowania próbki do analizy. Tak sporządzoną próbkę dozowano dwukrotnie do chromatografu gazowego w ilości 1  $\mu$ l.

Na rysunku 6 przedstawiono chromatogram z analizy steroli w próbce estrów metylowych kwasów tłuszczowych FAME pochodzących z oleju rzepakowego, natomiast na rysunku 7 zaprezentowano chromatogram z analizy steroli w próbce FAME pochodzących z oleju sojowego. Z kolei rysunek 8 przedstawia chromatogram z analizy steroli

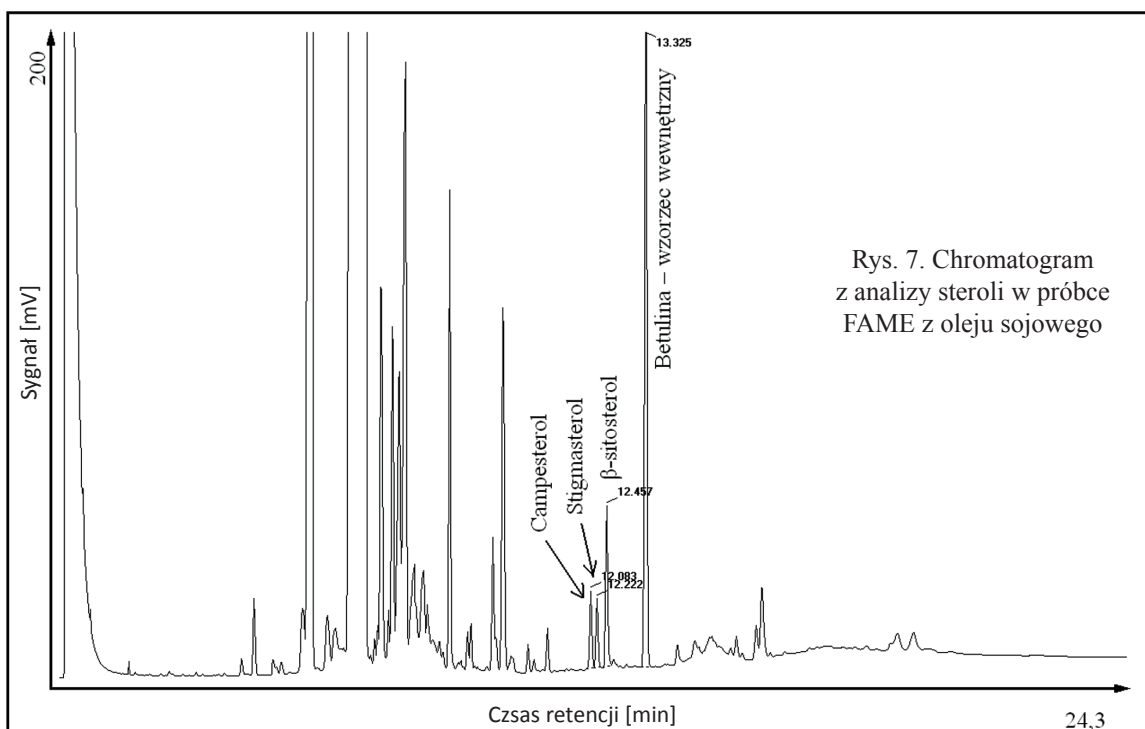
w próbce estrów metylowych kwasów tłuszczowych FAME pochodzących z tłuszczu zwierzęcego.

Jak uwidoczniło na tych chromatogramach, estry metylowe kwasów tłuszczowych pochodzących z oleju rzepakowego i oleju sojowego różnią się znacznie pomiędzy sobą pod względem obecnych w nich steroli oraz ich zawartości. Brassicasterol występuje jedynie w oleju rzepakowym w znaczących ilościach, natomiast olej sojowy zawiera znaczne ilości stigmasterolu, praktycznie nieobecnego w oleju rzepakowym. Na chromatogramie z analizy FAME pochodzącego z tłuszczu zwierzęcego widoczny jest jedynie pik cholesterolu i wzorca wewnętrznego.

W następnej kolejności wykonano badania zawartości steroli w próbkach handlowych FAME. Wykonano szereg



Rys. 6. Chromatogram z analizy steroli w próbce FAME z oleju rzepakowego



Rys. 7. Chromatogram z analizy steroli w próbce FAME z oleju sojowego

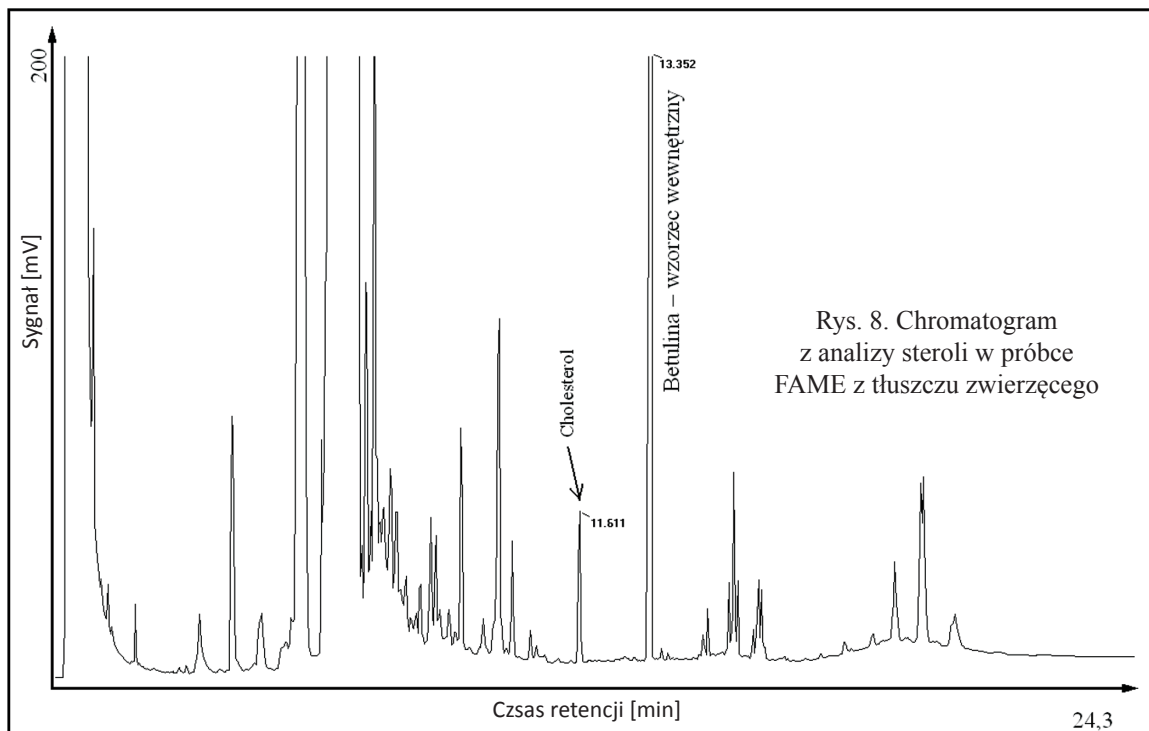
podwójnych oznaczeń dla archiwalnych, handlowych próbek estrów metylowych kwasów tłuszczowych FAME. Oznaczono zawartość poszczególnych steroli, jako dodatkową informację podano skład procentowy steroli, a otrzymane wyniki, wraz z uzyskanymi dla zbadanych wcześniej wzorcowych FAME z rzepaku i soi, przedstawiono w tabelicy 9.

Wyniki procentowej zawartości steroli pozwalają na identyfikację oleju roślinnego, z którego wytworzono FAME. W kolumnach 2 i 3 podano skład procentowy steroli dla wzorcowych estrów metylowych kwasów tłuszczowych

wytworzonych z oleju rzepakowego i sojowego. Ponieważ skład charakteryzuje się niewielką zmiennością, dodatek oleju innego pochodzenia jest możliwy do zaobserwowania poprzez znaczną zmianę w składzie procentowym oznaczanych steroli.

Porównując składy badanych próbek FAME, należy stwierdzić, że wszystkie badane próbki handlowe FAME wytworzono z rzepaku. W przypadku trzech przebadanych próbek FAME stwierdzono wprawdzie zwiększoną zawartość stigmasterolu, jednakże w przypadku zanieczyszczenia





Tablica 9. Wyniki oznaczeń zawartości steroli w FAME

Zawartość steroli [% (m/m)]	44/11 wzorcowe FAME RZEPAK	919/03 wzorcowe FAME SOJA	pr346	pr328	pr322	pr331	pr297	pr313	pr246	pr48-1
Brassicasterol	0,06	< 0,01	0,05	0,06	0,05	0,05	0,04	0,05	0,06	0,06
Campesterol	0,12	0,06	0,12	0,13	0,11	0,11	0,10	0,11	0,14	0,15
Stigmasterol	< 0,01	0,06	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,01	0,01	0,01	< 0,01	< 0,01
$\beta$ -sitosterol	0,19	0,13	0,18	0,21	0,18	0,19	0,18	0,18	0,21	0,21
SUMA	0,36	0,25	0,35	0,40	0,35	0,36	0,33	0,35	0,41	0,42
Skład procentowy steroli										
Brassicasterol	15,20	–	15,24	14,92	14,85	14,10	12,59	14,35	15,36	13,67
Campesterol	33,41	24,38	33,60	33,69	32,68	30,78	30,00	31,34	33,09	36,66
Stigmasterol	0,38	22,34	–	–	–	2,71	3,66	2,76	–	–
$\beta$ -sitosterol	51,01	53,29	51,15	51,38	52,47	52,41	53,76	51,55	51,05	49,68

próbki estrami metylowymi kwasów tłuszczowych z oleju sojowego powinien być widoczny wzrost zawartości campesterolu w sumie steroli na tle pozostałych składników próbek. W tym przypadku stwierdzono zmniejszenie jego zawartości, co wyklucza zanieczyszczenie badanych próbek estrami metylowymi kwasów tłuszczowych z oleju sojowego. W badanych próbkach nie stwierdzono obecności cholesterolu, nie stwierdzono zatem dodatku surowca zwierzęcego do surowca roślinnego.

Niniejsza metodyka posiada dużą przewagę nad innymi metodami oceny typu surowca zastosowanego do produkcji FAME, wykorzystującymi oznaczenie składu kwasów tłuszczowych.

Zapewnia możliwość badania obecności steroli charakterystycznych dla danego oleju lub tłuszczu, a także ocenę składu steroli, który charakteryzuje się niewielką zmiennością dla każdego z omawianych surowców do produkcji FAME. Metoda zapewnia zatem, poza typową identyfikacją rodzaju wyjściowego oleju, możliwość potwierdzenia lub wykluczenia z dużą pewnością statystyczną przypadków zastosowania surowców innego pochodzenia do produkcji estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Dzięki szybkości działania metodykę można wykorzystać w badaniu procesów wytwarzania biopaliw drugiej generacji, szczególnie z olejów roślinnych [5].

## Podsumowanie

Opracowana metodyka może być wykorzystana do oznaczenia zawartości steroli w estrach metylowych kwasów tłuszczowych w próbkach FAME. Przy użyciu dostępnych danych literaturowych o zawartości steroli, lub stosując własne materiały wzorcowe, możliwe jest uzyskanie informacji o pochodzeniu surowca roślinnego, jak również stwierdzenie dodatku surowca zwierzęcego do produktu naftowego.

Dla przebadanych próbek paliw handlowych typu czystych estrów metylowych kwasów tłuszczowych, na podstawie zidentyfikowanych steroli oraz ich składu, stwierdzono we wszystkich przypadkach zastosowanie oleju rzepakowego jako surowca do produkcji FAME. W przypadku badanych próbek nie wykryto obecności cholesterolu, mogącego wska-

zywać na użycie do produkcji FAME tłuszczów pochodzenia zwierzęcego.

Opisaną metodyką można w sposób szybki i nieskomplikowany sprawdzić skład wolnych steroli dla dowolnego oleju lub tłuszczu, po przeprowadzeniu jego transestryfikacji do FAME przed etapem przygotowania próbki. Planowane jest wykorzystanie metodyki do badania estrów metylowych kwasów tłuszczowych pochodzących z fałszerstw, jak i nieznanego pochodzenia. Dzięki uzyskanej selektywności metody, niniejszą metodyką, poza FAME, mogą być badane produkty naftowe o zakresie temperatur wrzenia do 350°C, bez konieczności ich wydzielania technikami chromatografii elucyjnej, stąd metoda umożliwi m.in. szybkie monitorowanie zmian zachodzących w biokomponentach paliw.

Prosimy cytować jako: Nafta-Gaz 2013, nr 8, s. 632–645

Artykuł powstał na podstawie pracy statutowej, na zlecenie INiG/MNiSW; nr archiwalny DK-4100-37/12, nr zlecenia: 0017/TA/12.

## Literatura

- [1] Abidi S. L.: *Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils*. Journal of Chromatography A 2001, vol. 935, pp. 173–201.
- [2] ASTM E 691 *Standard Practice for Conducting an Interlaboratory Study to Determine the Precision of a Test Method*.
- [3] Bockish M.: *Fats and Oils Handbook*. USA, AOCS Press, 1998.
- [4] Gunstone F. D.: *The chemistry of oils and fats*. USA, Blackwell Publishing Ltd., 2004.
- [5] Jęczmionek Ł.: *Odpadowe oleje roślinne jako surowiec do otrzymywania biokomponentów II generacji*. Nafta-Gaz 2011, nr 10, s. 742–748.
- [6] Jee M.: *Oils and Fats Authentication*. USA, Blackwell Publishing Ltd., 2002.
- [7] Lechner M., Reiter B., Lorbeer E.: *Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis*. Journal of Chromatography A 1999, vol. 857, pp. 231–238.
- [8] Moreau R. A., Scott M., Haas M. J.: *The Identification and Quantification of Steryl Glucosides in Precipitates from Commercial Biodiesel*. J. Am. Oil Chem. Soc. 2008, vol. 85, pp. 761–770.
- [9] Paavo Kalo, Tiia Kuuranne: *Analysis of free and esterified sterols in fats and oils by flash chromatography, gas chromatography and electrospray tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 2001, vol. 935, pp. 237–248.
- [10] Dutta P. C., Normen L.: *Capillary column gas-liquid chromatographic separation of D5-unsaturated and saturated phytosterols*. Journal of Chromatography A 1998, vol. 816, pp. 177–184.
- [11] PN-EN ISO 11702:2010 *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Enzymatyczne oznaczanie ogólnej zawartości steroli*.
- [12] PN-EN ISO 12228:2002 *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Oznaczanie poszczególnych steroli i ich całkowitej zawartości – Metoda chromatografii gazowej*.
- [13] PN-ISO 3594:2000 *Tłuszcz mleczny – Wykrywanie steroli tłuszczu roślinnego metodą chromatografii gazowej (metoda odwoławcza)*.
- [14] Rocco A., Fanali S.: *Analysis of phytosterols in extra-virgin olive oil by nano-liquid chromatography*. Journal of Chromatography A 2009, vol. 1216, pp. 7173–7178.
- [15] *Rozporządzenie Ministra Gospodarki z dnia 22 stycznia 2009 r. w sprawie wymagań jakościowych dla biopaliw ciekłych* (Dz.U. z 2009 r. Nr 18, poz. 98).
- [16] *Rozporządzenie Ministra Gospodarki z dnia 22 kwietnia 2010 r. w sprawie metod badania jakości biopaliw ciekłych* (Dz.U. z 2010 r. Nr 78, poz. 520).
- [17] Tang H., De Guzman R. C., Salley S. O., Simon Ng K. Y.: *Formation of Insolubles in Palm Oil-, Yellow Grease-, and Soybean Oil-Based Biodiesel Blends After Cold Soaking at 4°C*. J. Am. Oil Chem. Soc. 2008, vol. 85, pp. 1173–1182.
- [18] Tang H., Salley S. O., Simon Ng K. Y.: *Fuel properties and precipitate formation at low temperature in soy-, cottonseed-, and poultry fat-based biodiesel blends*. Fuel 2008, vol. 87, pp. 3006–3017.



Mgr inż. Zygmunt BURNUS  
Asystent w Zakładzie Analiz Naftowych.  
Instytut Nafty i Gazu  
ul. Lubicz 25A  
31-503 Kraków  
E-mail: burnus@inig.pl