



Evoluzione delle metodiche di caratterizzazione del biodiesel

Paolo Bondioli

Stazione Sperimentale Oli e Grassi (SSOG - IT)

Milano, 11 Novembre 2009



Il Progetto BIOSCOPEs

BIOSCOPEs

EU tender BIOSCOPEs, task 1

- 4 partners: ASG, ITERG, SSOG, UNIGRAZ
- Coordinatore: AGQM-Berlino
- Periodo di attività: 2006-2008



Il progetto BIOSCOPEs

RESPONSABILITA'

ASG → revisione di EN 14078

ITERG → revisione di EN 14103

SSOG → revisione di EN 14105

UNIGRAZ → nuovo metodo per PUFA (ora EN 15779)

BIOSCOPEs



Il progetto BIOSCOPES

Strategia di approccio

- Valutazione critica del problema (tutti i partners)
- 1 partner responsabile per lo sviluppo di 1 metodo
- Il partner responsabile sviluppa/migliora il metodo
- Mini RRT all'interno del gruppo
- In caso di esito positivo → CEN RRT

BIOSCOPES

EN 14103/14105 - Significato diagnostico



- 🕒 I due metodi rappresentano lo scheletro di EN 14214 "European Standard on biodiesel"
- 🕒 EN 14103 - Determinazione del contenuto in estere metilico e in estere metilico dell'acido linolenico

Purezza del Biodiesel

- 🕒 EN 14105 - Determination of free and bonded glycerol, mono-, di- and triglycerides

Qualita' del Biodiesel

**ENTRAMBI I METODI SONO STATI
MESSI A PUNTO UTILIZZANDO RME
COME RIFERIMENTO**



EUROPEAN STANDARD
NORME EUROPÉENNE
EUROPÄISCHE NORM

EN 14103

April 2003

ICS 67.200.10

English version

**Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) -
Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents**

Produits dérivés des corps gras - Esters méthyliques
d'acides gras (EMAG) - Détermination de la teneur en ester
et en ester méthylique de l'acide linoléinique

Erzeugnisse aus pflanzlichen und tierischen Fetten und
Ölen - Fettsäure-Methylester (FAME) - Bestimmung des
Ester-Gehaltes und des Gehaltes an Linoleinsäure-
Methylester

Revisione di EN 14103



EN 14103 - Problemi Principali

- **Insufficiente precisione (R=3.1)**
- Non consente di considerare la presenza di biodiesel da grassi animali
- Non considera la possibile presenza di biodiesel da oli laurici



EN 14103 - Problemi Principali

□ Due risultati analitici prodotti da due diversi laboratori sono considerati equivalenti se la loro differenza è minore di 3,1

□ Ad esempio:

Ester Content = 95,0 vs 98,1 !!!!

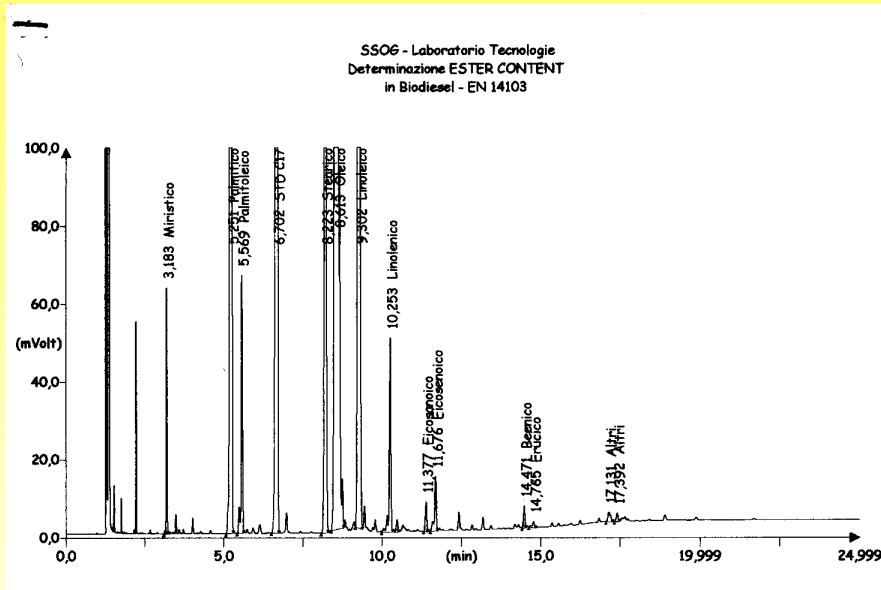


EN 14103 - Problemi Principali

- Insufficiente precisione (R=3.1)
- Non consente di considerare la presenza di biodiesel da grassi animali
- Non considera la possibile presenza di biodiesel da oli laurici

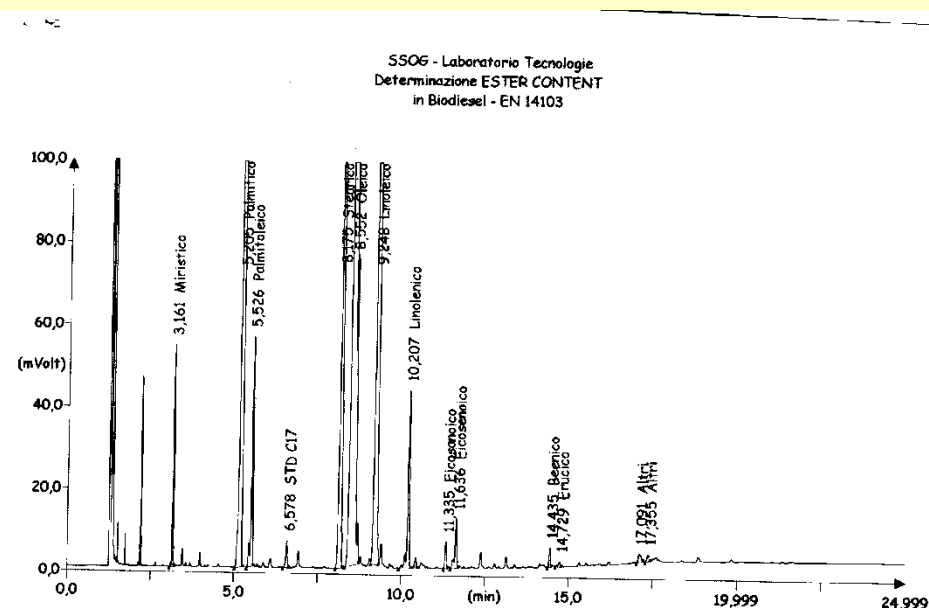
EN 14103 - Problemi Principali

Presenza di grassi animali



Corretta esecuzione della prova
Ester Content: 93,0 % (m/m)

Tenendo presente la presenza di
C17 FAME di origine endogena
Ester Content: 96,7 % (m/m)



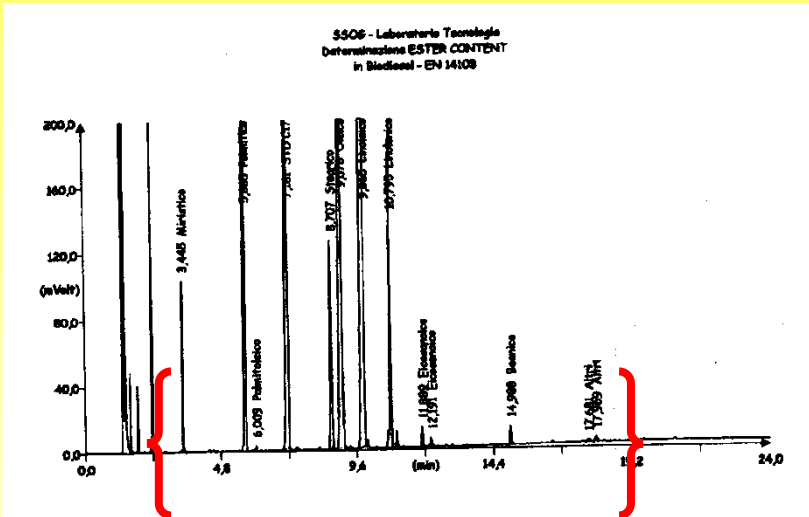


EN 14103 - Problemi Principali

- Insufficiente precisione (R=3.1)
- Non consente di considerare la presenza di biodiesel da grassi animali
- Non considera la possibile presenza di biodiesel da oli laurici

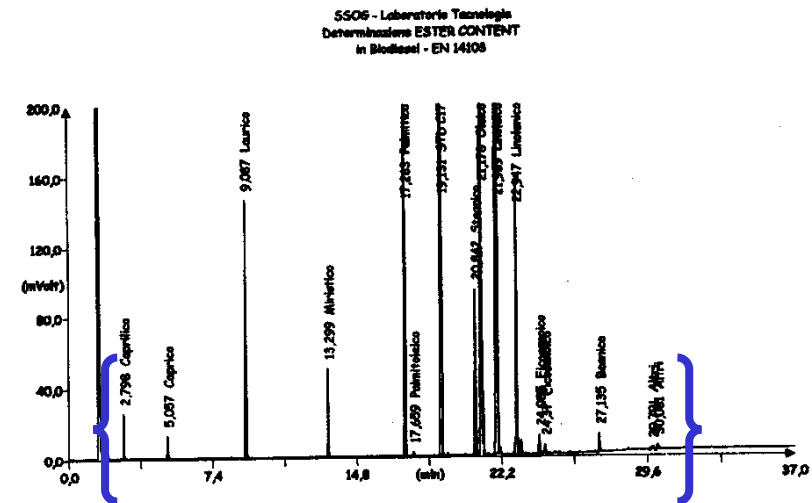
EN 14103 - Problemi Principali

Presenza di oli laurici



Integrazione C14 - C24
Ester Content: 91.6 % (m/m)

Integrazione C6 - C24
Ester Content: 97.1 % (m/m)





EN 14103 - Case Study

- ✓ Il metodo base (ISO 5508:1990): conosciuto e diffuso standard per la determinazione della composizione in acidi grassi
- ✓ Il metodo base è molto preciso per lo scopo principale che esprime il risultato come composizione relativa
- ✓ La differenza principale tra ISO 5508 e EN 14103 è l'impiego di un riferimento interno
- ✓ Piccole differenze nell'integrazione dei picchi del campione e del riferimento interno provocano ampie variazioni del risultato finale

EN 14103 - Approccio



- ✓ Punto di partenza: la tecnica in uso ha già espresso il suo potenziale
- ✓ Sono state esplorate nuove possibilità
 - Sistemi GC diversi (iniezione on-column, colonne capillari non polari)
 - HPLC SEC rivelazione a indice di rifrazione
 - Cromatografia in colonna con valutazione gravimetrica
 - Determinazione del numero di saponificazione accoppiato alla determinazione della composizione acidica

*In ogni caso: esito **NEGATIVO***

*Decisione: migliorare **EN 14103***

Back to EN 14103



- ❑ Informazione dal mirror group UNICHIM:
aumentando la concentrazione del riferimento interno la
precisione migliora
- ❑ Schober et al.: possibilità di includere nello scopo
FAMEs (C₆ to C₁₂) → CNO and PKO biodiesels
(Eur. J. Lipid Sci. Technol. (2006), 108, 309-314)
- ❑ Sostituendo il riferimento interno FAME C₁₇ con
FAME C₁₉ si risolve il problema del FAME da grasso
animale
- ❑ Tests realizzati presso ITERG → OK
- ❑ RRT in ambito CEN TC 19/307 JWG → risultati scarsi



Miglioramenti di EN 14103

Decisioni per il nuovo RRT

- Scelta della colonna : Carbowax 20M obbligatoria
- Campione e riferimento interno sciolti in solvente più polare
- Miglioramento del test, migliore descrizione dell'identificazione del picco C_{18:3}-FAME
- Attento controllo dell'acqua presente nel riferimento interno

Nuovo EN 14103 - parametri di precisione

$r = 1,1$ (vers. 2003 $\rightarrow 1,8$)

$R = 3,6$ (vers. 2003 $\rightarrow 3,1$)

PRINCIPALI VANTAGGI OTTENUTI

- Estensione dello scopo a FAME da oli laurici
- Estensione dello scopo a FAME da grassi animali



EUROPEAN STANDARD
NORME EUROPÉENNE
EUROPÄISCHE NORM

EN 14105

April 2003

ICS 67.200.10

English version

**Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) -
Determination of free and total glycerol and mono-, di-,
triglyceride contents (Reference method)**

Produits dérivés des corps gras - Esters méthyliques
d'acides gras (EMAG) - Détermination de la teneur en
glycérols libre et total et en mono-, di- et triglycérides -
Méthode de référence

Erzeugnisse aus pflanzlichen und tierischen Fetten und
Ölen - Fettsäure-Methylester (FAME) - Bestimmung des
Gehaltes an freiem und Gesamtglycerin und Mono-, Di- und
Triglyceriden (Referenzmethode)

Revisione di EN 14105



EN 14105 - Principali problemi

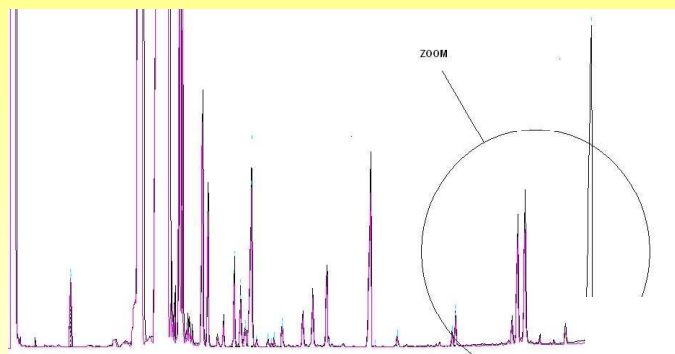
- Problemi di precisione per la determinazione dei TG ($R = 0,2099X + 0,0641$)
- ⑩ Biodiesel da PKO e CNO fuori da scopo
- Biodiesel da grassi animali fuori da scopo



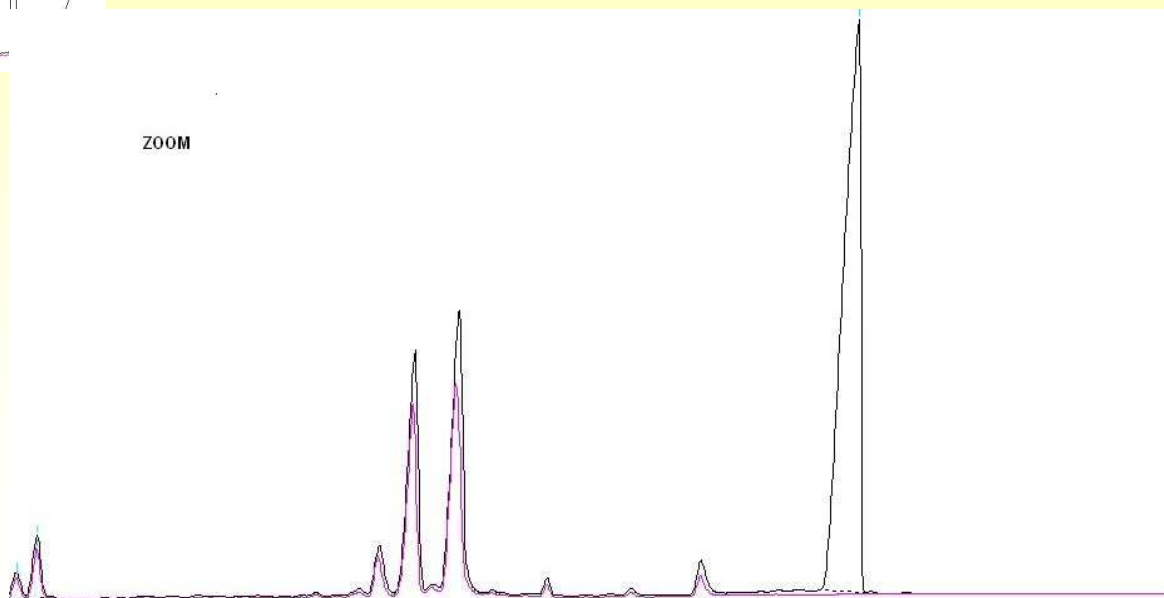
EN 14105 - Case Study

- ✓ Il principale problema è stato identificato nella degradazione delle prestazioni della colonna GC
- ✓ Questo fenomeno è particolarmente evidente nella risposta dei TG
- ✓ Il decadimento della risposta dei TG con l'uso è stata dimostrata

BIOSCOPIES



EN 14105 monitoraggio delle prestazioni GC con TG C57



EN 14105 - Approccio al problema



- ✓ Punto di partenza: metodo attuale come punto di partenza per la nuova procedura
- ✓ Esplorare nuove possibilità
 - Impiego di TG C57 per il monitoraggio dello stato di salute della colonna
 - TG C57 può essere usato come riferimento interno per la valutazione diretta dei TG
 - Se si può fare per i TG, allora la tecnica è applicabile anche ai MG e DG

(ritorno a UNI 22053:1996 !!)

Impiego di tre diversi riferimenti interni

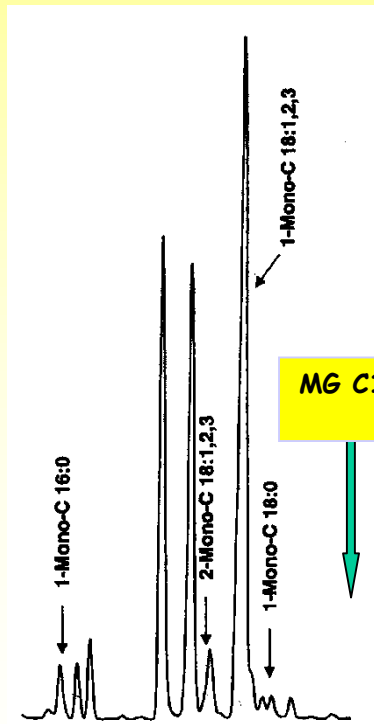


Figure C.2 — Monoacylglycerides

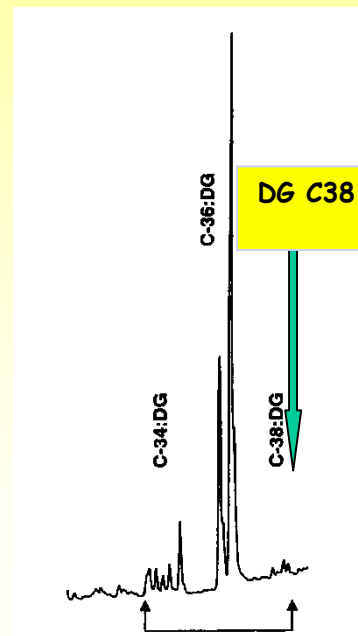


Figure C.3 — Diacylglycerides

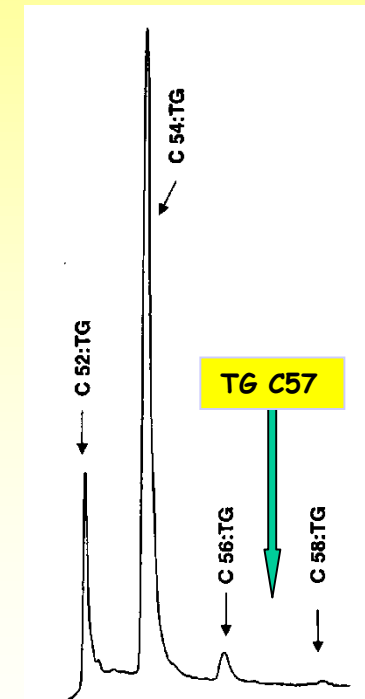
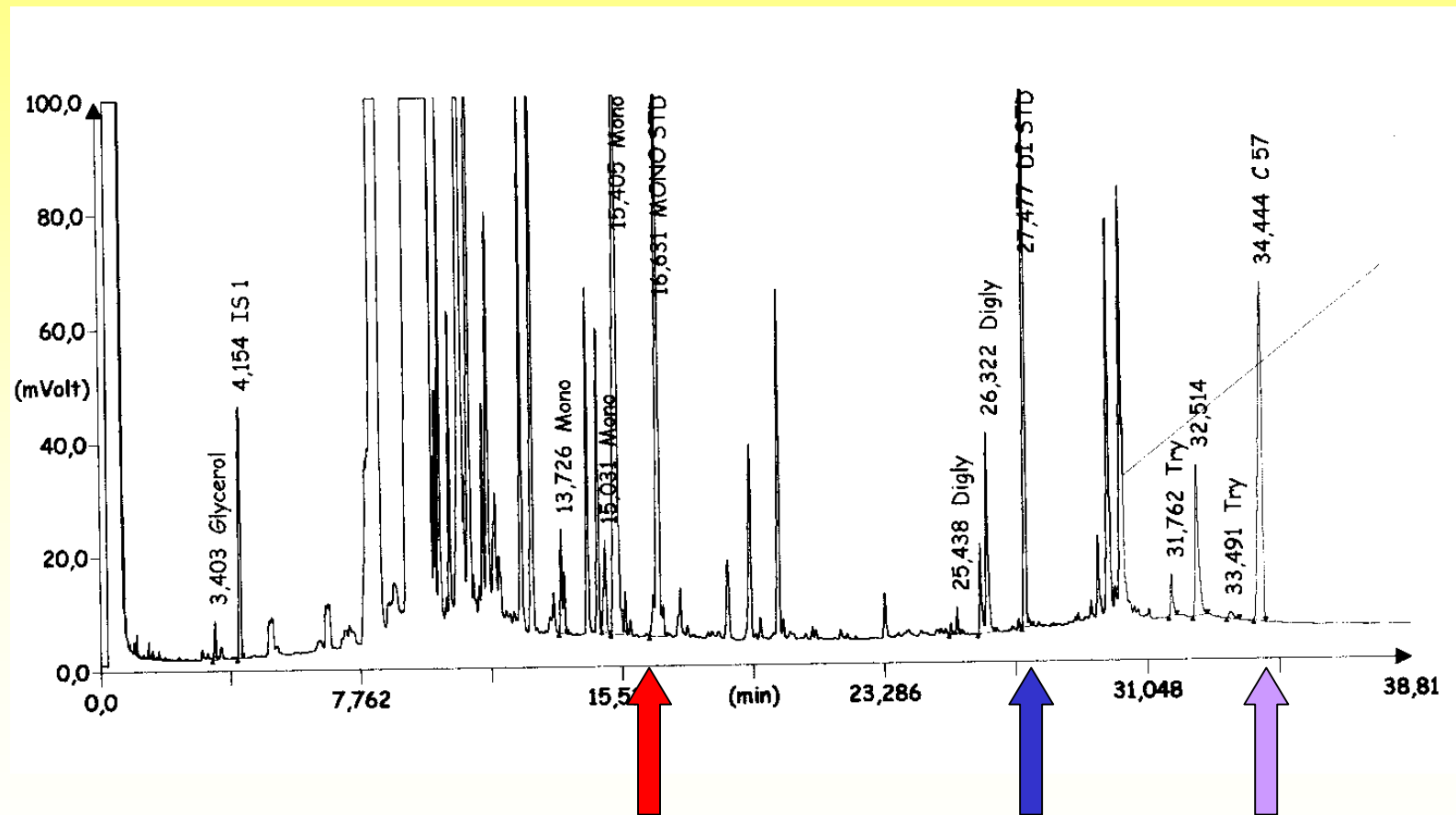


Figure C.4 — Triacylglycerides

***EN 14105 - Principali variazioni
della procedura***

- 3 riferimenti interni al posto di una calibrazione con TG C₃₀
- Monitoraggio continuo dello stato di salute della colonna cromatografica
- *La determinazione del glicerolo non cambia*

Il tracciato modificato di EN 14105



Conclusioni delle prove preliminari

Si è dimostrato che la procedura modificata:

- ☞ E' di facile realizzazione
- ☞ E' più semplice (eliminata calibrazione per MG, DG e TG)
- ☞ Consente di superare i problemi della degradazione della colonna
- ☞ Fornisce gli stessi risultati della EN 14105:2003
- ☞ Sembra avere una migliore riproducibilità

Al Round Robin CEN

Organizzazione del RRT

- ☉ 6 campioni distribuiti con tutti i necessari riferimenti interni
- ☉ prove da realizzare in doppio su ogni campione
- ☉ 21 laboratori hanno ricevuto i campioni
- ☉ 16 laboratori hanno risposto nei tempi previsti
- ☉ RRT concluso alla fine di febbraio 2008
- ☉ Florence Lacoste (ITERG) ha elaborato i risultati

Risultati del RRT

FREE GLY						
Sample	1	2	3	4	5	6
mean value	0,0074	0,0060	0,0134	0,0093	0,0031	0,0121
r	0,0014	0,0010	0,0023	0,0022	0,0007	0,0018
R	0,0071	0,0065	0,0095	0,0072	0,0037	0,0090
2R/spec value (0,02)	0,71	0,65	0,95	0,72	0,37	0,90
2R/mean value	1,92	2,17	1,42	1,55	2,39	1,49
R (EN 14105:2003)	0,0074	0,0066	0,0110	0,0086	0,0049	0,0102

Risultati del RRT

MONOGLYCERIDES						
Sample	1	2	3	4	5	6
mean value	0,4265	0,4338	0,6155	0,7612	0,3031	0,8101
r	0,0371	0,0356	0,0618	0,0752	0,0222	0,0442
R	0,1480	0,1683	0,1779	0,2104	0,0718	0,1643
2R/spec value (0,8)	0,37	0,42	0,44	0,53	0,18	0,41
2R/mean value	0,69	0,78	0,58	0,55	0,47	0,41
R (EN 14105:2003)	0,1859	0,1868	0,2093	0,2274	0,1706	0,2335

Risultati del RRT

DIGLYCERIDES

Sample	1	2	3	4	5	6
mean value	0,1420	0,1597	0,1724	0,2994	0,1846	0,0808
r	0,0173	0,0169	0,0200	0,0519	0,0215	0,0116
R	0,0594	0,0524	0,0549	0,0946	0,0520	0,0428
2R/spec value (0,2)	0,59	0,52	0,55	0,95	0,52	0,43
2R/mean value	0,84	0,66	0,64	0,63	0,56	1,06
R (EN 14105:2003)	0,0523	0,0557	0,0581	0,0825	0,0604	0,0405

Risultati del RRT

TRIGLYCERIDES						
Sample	1	2	3	4	5	6
mean value	0,1726	0,0534	0,0725	0,1548	0,3188	0,0719
r	0,0204	0,0160	0,0148	0,0198	0,0319	0,0114
R	0,1402	0,0566	0,0641	0,1349	0,1210	0,0509
2R/spec value (0,2)	1,40	0,57	0,64	1,35	1,21	0,51
2R/mean value	1,62	2,12	1,77	1,74	0,76	1,42
R (EN 14105:2003)	0,1003	0,0753	0,0793	0,0966	0,1310	0,0792

Risultati del RRT

TOTAL GLYCEROL						
Sample	1	2	3	4	5	6
mean value	0,1561	0,1458	0,2027	0,2629	0,1393	0,2383
r	0,0093	0,0147	0,0217	0,0373	0,0049	0,0138
R	0,0365	0,0415	0,0476	0,0638	0,0283	0,0436
2R/spec value (0,25)	0,29	0,33	0,38	0,51	0,23	0,35
2R/mean value	0,47	0,57	0,47	0,49	0,41	0,37
R (EN 14105:2003)	0,0598	0,0552	0,0806	0,1076	0,0523	0,0966

CONCLUSIONI

- **MIGLIORAMENTO NELLA DETERMINAZIONE DEI TRIGLICERIDI**
- **SEMPLIFICAZIONE DELLA PROCEDURA/MIGLIORE CONTROLLO DELL'APPARECCHIATURA**
- **MIGLIORAMENTO GENERALE DELLA PRECISIONE (TOTAL GLYCEROL)**
- **APPLICABILE AI BIODIESEL DA GRASSI ANIMALI**
- **ANCORA NON APPLICABILE A BIODIESEL DA PKO E CNO**

prEN 15779 - Significato diagnostico



- Rivelazione di aggiunte di FAME prodotti con oli di pesce
- Nell'olio di pesce sono presenti acidi grassi polinsaturi a lunga catena (C20 - C22, fino a 6 doppi legami)
- Impatto sulla stabilità ossidativa e sul CCR del biodiesel anche a basse concentrazioni
- EN 14214:2003 - Limite max PUFA 1 % m/m, senza indicazione della metodica
- EN 14214:2008 - idem, con la menzione *"a suitable method is under development by CEN"*

prEN 15779 - Survey sulle composizioni acide

I FAME da olio di pesce sono miscele molto complesse di acidi grassi

Il limite max 1 % in PUFA andava spalmato su numerosi FAME (1% è la somma di tutti !)

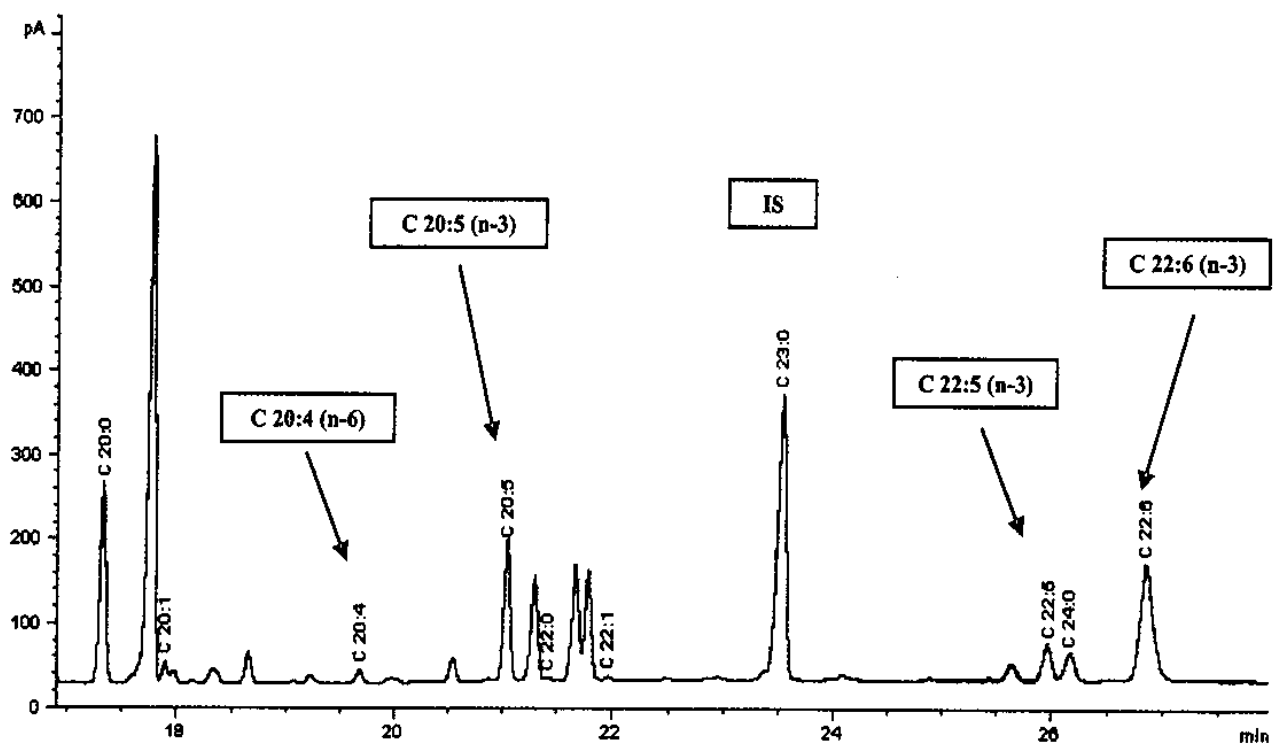
Dopo ampia ricerca bibliografica si è deciso di selezionare dei markers e determinare solo quelli

Esempi di biodiesel da olio di pesce

Table 2. Analytical data of fish oil methyl esters.

Property	Test method	Unit	Cod liver	Herring	Tuna	Sardine	Salmon	Salmon/ Mackerel	Limit
Ester content	EN 14103	[% m/m]	97.5	96.9	97.1	98.2	97.5	96.7	≥96,5
Water content	EN ISO 12937	[mg/kg]	200	200	300	200	400	300	≤500
Acid value	EN 14104	[mg KOH/g]	0.17	0.27	0.22	0.21	0.20	0.14	≤0.50
Oxidation stability	EN 14112	[h]	<1	<1	<1	<1	<1	<1	≥6.0
Alcohol content	EN 14110	[% m/m]	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	≤0.20
Monoglycerides	EN 14105	[% m/m]	0.36	0.30	0.17	0.21	0.16	0.36	≤0.80
Diglycerides	EN 14105	[% m/m]	0.04	0.05	<0.01	0.06	0.04	<0.01	≤0.20
Triglycerides	EN 14105	[% m/m]	<0.01	<0.01	<0.01	0.02	0.02	<0.01	≤0.20
Free glycerol	EN 14105	[% m/m]	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	≤0.020
Total glycerol	EN 14105	[% m/m]	0.09	0.08	0.04	0.06	0.05	0.09	≤0.25

prEN 15779 - FAMES Marker



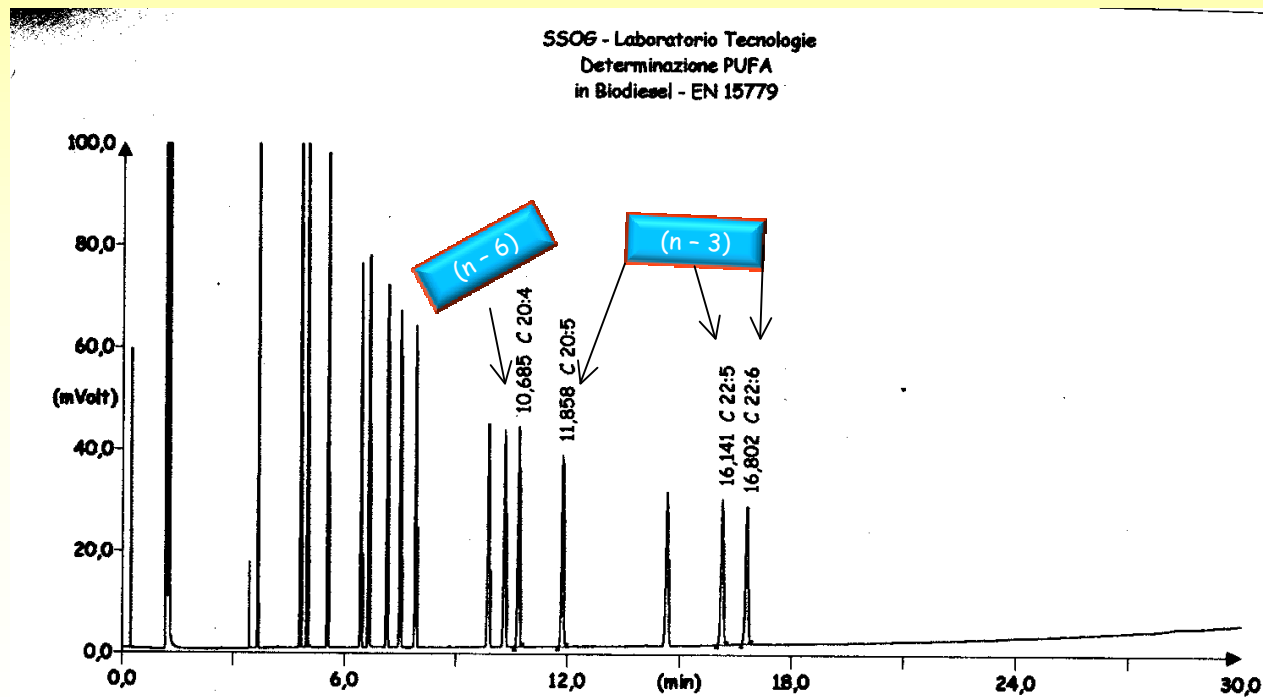
prEN 15779 - Apparecchiatura

- Gascromatografo capillare, con sistema di iniezione split
- Carrier gas: elio o idrogeno
- Colonna capillare di tipo WAX, l= 30 m, ID 0,20-0,32 mm, film thickness 0,25 micron
- Programma di temperatura adattato per la migliore separazione dei PUFA

In pratica si utilizza la stessa apparecchiatura di EN 14103

prEN 15779 - Materiali

- Estere metilico C 23:0, min. 99,5%
- Eptano, puro per analisi
- Miscela PUFA di riferimento



prEN 15779 - II RRT CEN

Sample	1	2	3	4	5	6
(No. of labs) valid labs	(11) 11	(11) 11	(11) 11	(11) 11	(11) 10	(11) 9
Mean value [% m/m]	1.084	1.323	1.117	0.932	1.526	0.998
Repeatability SD [% m/m]	0.027	0.033	0.023	0.015	0.026	0.009
Reproducibility SD [% m/m]	0.089	0.056	0.081	0.104	0.105	0.097
Repeatability r [% m/m]	0.084	0.104	0.070	0.045	0.082	0.037
Reproducibility R [% m/m]	0.276	0.169	0.252	0.329	0.332	0.317
Degree of freedom (R)	11	14	11	10	10	8
AD criteria (Round Robin)	0.692	0.501	0.549	0.570	0.370	0.474

prEN 15779 - II RRT CEN

Sample	1	2	3	4	5	6
(No. of labs) valid labs	(11) 11	(11) 11	(11) 11	(11) 11	(11) 10	(11) 9
Mean value [% m/m]	1.084	1.322	1.147	0.932	1.526	0.098
Repeatability SD [% m/m]	0.027	0.033	0.023	0.015	0.026	0.009
Reproducibility SD [% m/m]	0.089	0.056	0.081	0.104	0.105	0.097
Repeatability r [% m/m]	0.084	0.104	0.070	0.045	0.082	0.027
Reproducibility R [% m/m]	0.276	0.169	0.252	0.329	0.332	0.317
Degree of freedom (R)	11	14	11	10	10	8
AD criteria (Round Robin)	0.692	0.501	0.549	0.570	0.370	0.474

prEN 15779 - Parametri di precisione

$$\text{Repeatability: } r = 0.0199 + 0.0481X \quad (3)$$

$$\text{Reproducibility: } R = 0.3423 - 0.0580X \quad (4)$$

Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2009, 111, 829–834

Research Paper

A method for the determination of polyunsaturated fatty acid methyl esters in biodiesel: Results of an interlaboratory study

Sigurd Schober, Ingrid Seidl, Andreas Meinitzer and Martin Mittelbach

Institute of Chemistry, University of Graz, Graz, Austria

2nd International Congress on Biodiesel: The Science and The Technologies

15-17 November 2009

The Westin Grand München Arabellapark • Munich, Germany



BIOSCOPEs



Thank you for your attention



Stazione Sperimentale per
le Industrie degli Oli e dei Grassi

Dr. Paolo Bondioli

Head of Technology Department

20133 Milano
Via G. Colombo 79
Tel. + 39 02.70.64.97.1
Fax + 39 02.23.63.953
e-mail: bondioli@ssog.it



MANY THANKS TO MY COLLEAGUES AND FRIENDS:

Laura Della Bella - SSOG (IT)

Juergen Fischer - ADM (DE)

Jens Haupt - AGQM (DE)

Florence Lacoste - ITERG (FR)

Martin Mittelbach and Sigurd Schober - UNIGRAZ (AT)

Thomas Wilharm - ASG (DE)