

9. 生質柴油之品質與檢驗

9.2 游離甘油與總甘油含量之測定

甘油 (Glycerin) 可分成游離甘油 (Free glycerin) 與鍵結甘油 (Bound glycerin) (包括單酸甘油酯、雙酸甘油酯與三酸甘油酯)，合稱總甘油 (Total glycerin)，是生質柴油製程之副產品與轉酯化反應不完整之殘餘物，其含量高低成為生質柴油品質之指標之一；若其中之游離甘油過高，則儲存及燃油系統可能因甘油分離而衍生其他問題；若總甘油含量過高，則將導致注射器阻塞 (Clogged) 與注射器之噴嘴、活塞和汽門積垢 (Build up)。

早期對游離甘油與鍵結甘油之測定係分開進行，Plank 與 Lorbeer (1992) 以菜籽油脂肪酸甲酯 (Rapeseed oil methyl esters, RME) 為對象，利用氣相層析法 (Gas chromatography)，測定單酸甘油酯 (Monoglycerides)、雙酸甘油酯 (Diglycerides) 與三酸甘油酯 (Triglycerides) 之含量；該研究將濃度為 5 mg/ml、適量之單油酸甘油酯 (Monoolein)、雙油酸甘油酯 (Diolein) 與三油酸甘油酯 (Triolein) 之己烷 (Hexane) 溶液，和 100 μ l、濃度為 8 mg/ml 之三葵酸甘油酯 (Tridecanoin or Tricaprin) (Internal standard, 內標) 之己烷溶液置入螺旋蓋式玻璃瓶 (Screw-cap vial)，然後於室溫下利用氮氣流移除其中之己烷，接著加入 400 μ l 之吡啶 (Pyridine) 與 200 μ l 之 N,O-雙三甲基矽氧基三氟乙醯胺 (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, BSTFA)，以製備濃度為 0.008 mg/ml ~ 0.130 mg/ml 不等之標準溶液 (Standard solution)，經過簡單之搖晃，將玻璃瓶加熱至 70°C，並持續 15 分鐘，再冷卻至室溫，使其中之單油酸甘油酯與雙油酸甘油酯矽化 (Silylate)，並以氮氣移除瓶內之揮發性物質，然後將製備之樣品溶於甲苯 (Toluene) 並稀釋至 9 ml。在待測樣品之製備上，將 100 μ l 之三葵酸甘油酯之己烷溶液 (Internal standard, 內標) 加入置於螺旋蓋式玻璃瓶內之 RME (100~110 mg) 中，然後於室溫下利用氮氣流移除其中之己烷，接著加入 400 μ l 之吡啶與 200 μ l 之 BSTFA，經過激烈之搖晃混合後，將玻璃瓶加熱至 70°C，並持續 15 分鐘，再冷卻至室溫，使其中之單油酸甘油酯與雙油酸甘油酯矽化，並以氮氣移除瓶內之揮發性物質然後將製備之樣品溶於甲苯 (Toluene) 並稀釋至 9 ml。在氣相層析部分，係使用 Carlo Erba MEGA 5300 氣相層析儀，配置柱頭注射器 (On-column injector) 與火焰離子化偵測器 (Flame ionization detector; FID)，而搭配之管柱規格為 10 m x 0.25 mm 且內壁塗佈 5% 苯基聚二甲基矽氧烷 (5% phenyl polydimethyl siloxane)、厚度為 0.15 μ m 之石英毛細管 (Fused silica capillary column)，並以 2.5 m x 0.53 mm、未塗層之管柱安裝在注射器後再承接分析管柱。層析時，將 1 μ l 之樣品於管柱初溫為 115°C 下注入柱頭注射器，經過 1 分鐘之恆溫期後，先以 30°C/min 之升溫速度加熱至 180°C，再以 7°C/min 之升溫速度加熱至 230°C，最後以 30°C/min 之升溫速度加熱至 370°C，並停留 8 分鐘；載氣為氫氣，氣體流量為 2.9 ml/min。在待測樣品測定前，先以含有已知量之單油酸甘油酯、雙油酸甘油酯與三油酸甘油酯，和三葵酸甘油酯 (Internal standard, 內標) 之標準溶液，進行四次之氣相層析，測定個別成分之峰面積 (Peak area) A_c 與三葵酸甘油酯之峰面積 A_{st} ，並建立面積比 (A_c/A_{st}) 與重量比 (

W_c/W_{st}) 之校正曲線，結果顯示除了三油酸甘油酯在濃度低於 0.05 mg/ml 下，呈現非線性外，單油酸甘油酯與雙油酸甘油酯之面積比與重量比在測定之濃度範圍內皆呈現線性關係。此外，該研究也以三種待測樣品為對象，分別針對其中之單油酸甘油酯、雙油酸甘油酯與三油酸甘油酯含量進行五次之測定，以及同一待測樣品，同時其中之單油酸甘油酯、雙油酸甘油酯與三油酸甘油酯含量進行五次之測定，以檢驗研究方法之重複性 (Reproducibility)，發現本研究所使用之方法重複性很高。

Mittelbach (1993) 以菜籽油脂肪酸甲酯 (Rapeseed oil methyl esters, RME) 為對象，利用氣相層析法 (Gas chromatography)，測定游離甘油 (Free glycerol) 之含量；該研究先將蒸餾過之 RME，利用 0.1 M 之 HCl 萃取三次，以移除殘餘之甘油，然後以 Na_2SO_4 加以乾燥並過濾，成為不含甘油之 RME 標準溶液，然後將三種已知量之游離甘油溶於二甲基甲醯胺 (Dimethylformamide, DMF) 中，加入不含甘油之 RME 標準溶液，以製備之三種不同樣品進行 Recovery test；待測游離甘油之四個 RME 樣品，有二個來自業者，另二個來自實驗室，檢測前先將 100~500 μ l 之 RME 樣品與 100 μ l 之 1,4-丁二醇 (1,4-Butanediol) (Internal standard, 內標) 與 600~200 μ l 之 DMF 混合，再加入 N,O-雙三甲基矽氧基三氟乙醯胺 (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, BSTFA) 使得總量達 1 ml，混合溶液經激烈攪拌至少 10 分鐘，取其 2 μ l 進行氣相層析，並將測定結果與酵素反應測定法 (Enzymatic determination) 加以比較。在氣相層析部分，係使用 HP 5890 氣相層析儀，配置分流 / 不分流之樣品注射系統 (Split/ Splitless Injection system)，並搭配火焰離子化偵測器 (Flame ionization detector; FID) 或質譜儀 (Mass spectrometry; MS)；搭配 FID 者，係使用 60 m \times 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m 之石英毛細管 (Fused silica capillary column) DB-5，注射器與偵測器之溫度為 250 $^{\circ}$ C，管柱之初溫為 110 $^{\circ}$ C，升溫速度為 5 $^{\circ}$ C/min，最終溫度為 250 $^{\circ}$ C，停留時間為 15 分鐘，注射分流比為 1:10，載氣為氦氣；搭配 MS 者，係使用 60 m \times 0.25 m、膜厚 0.25 μ m 之石英毛細管 (Fused silica capillary column) DB-5MS，注射器與偵測器之溫度為 250 $^{\circ}$ C，管柱之初溫為 100 $^{\circ}$ C (停留時間 2 分鐘)，升溫速度為 10 $^{\circ}$ C/min，最終溫度為 250 $^{\circ}$ C，停留時間為 15 分鐘，注射分流比為 1:30，載氣為氦氣。由於所適用之內標與游離甘油標準溶液之比例為 1:1，因此待測樣品之游離甘油濃度為：

$$\% \text{ Free glycerol} = (c_1 \times A_2 \times R \times 100) / (A_1 \times w)$$

$$R = (A_1 / c_1) / (A_2 / c_2)$$

其中，R 為 Response factor

A_1 為矽化之 1,4-丁二醇之峰面積

c_1 為 1,4-丁二醇之濃度

A_2 為矽化之游離甘油之峰面積

c_2 為游離甘油之濃度

w 為待測樣品之重量

研究結果顯示：氣相層析法對於游離甘油之測定具有相當高之靈敏度，特別是純度較高之蔬菜油甲酯，氣相層析法顯然比酵素反應測定法佳；FID 與 MS 偵測方式中，以 MS 較佳。

Plank 與 Lorbeer (1995) 以菜籽油脂肪酸甲酯 (Rapeseed oil methyl esters, RME) 為對象，發展出利用氣相層析法同步測定游離甘油、單酸、雙酸與三酸甘油酯之程序。該研究將溶於吡啶 (Pyridine)，濃度為 0.5 mg/ml 之甘油、4.0 mg/ml 之單油酸甘油酯 (Monoolein)、4.0mg/ml 之雙油酸甘油酯 (Diiolein)、5.0 mg/ml 之三油酸甘油酯 (Triolein)、3.0 mg/ml 之 1,2,4-丁三醇 (1,2,4-Butanetriol) (Internal standard, 內標) 與 8.0 mg/ml 之三葵酸甘油酯 (Tricaprin) (Internal standard, 內標) 作為儲備溶液，取定量之單油酸甘油酯、雙油酸甘油酯與三油酸甘油酯儲備溶液，和 70 μ l 之 1,2,4-丁三醇儲備溶液與 100 μ l 之三葵酸甘油酯儲備溶液混合於螺旋蓋式玻璃瓶內，以製作出單油酸甘油酯濃度為 0.001 ~ 0.006 mg/ml、雙油酸甘油酯濃度為 0.005~0.063 mg/ml、三油酸甘油酯濃度為 0.007~0.110 mg/ml、1,2,4-丁三醇濃度為 0.022 mg/ml、三葵酸甘油酯濃度為 0.090 mg/ml 之五種標準溶液 (Standard solution)。在待測樣品之製備上，將 100 μ l 之三葵酸甘油酯儲備溶液 (Internal standard, 內標) 與 70 μ l 之 1,2,4-丁三醇儲備溶液 (Internal standard, 內標) 加入置於螺旋蓋式玻璃瓶內之 RME (100~110 mg) 中，接著加入加入 100 μ l 之 N-甲基-N-三甲基矽氧基三氟乙醯胺 (N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide; MSTFA) 與吡啶 (論文未說明加入吡啶與數量)，於室溫下持續 15 分鐘，再將矽化之混合液溶於正庚烷 (n-heptane) 稀釋至 9 ml。在氣相層析部分，係使用 Fisons Instruments GC 8000 氣相層析儀，配置柱頭注射器 (On-column injector) 與火焰離子化偵測器 (Flame ionization detector; FID)，而搭配之管柱規格為 10 m x0.32 mm、膜厚 0.1 μ m 之石英毛細管 (Fused silica capillary column) DB-5，並以 2 m x0.53 mm、未塗層 (Uncoated) 且去活性 (Deactivated) 之管柱安裝在注射器後再承接分析管柱；層析時，以 AS 800 自動化取樣器將 1 μ l 之樣品於管柱初溫為 50°C 下注入柱頭注射器，經過 1 分鐘之恆溫期後，先以 15°C/min 之升溫速度加熱至 180°C，再以 7°C/min 之升溫速度加熱至 230°C，最後彈道式之升溫速度加熱至 370°C，並停留 10 分鐘；載氣為氫氣，氣體流量為 3 ml/min (於 50°C 量測)；偵測器之溫度為 370°C。該研究將游離甘油與部分甘油酯矽化對於層析效果與結果之影響，並列出可以完全將游離甘油、單酸甘油酯與雙酸甘油酯矽化之四個條件：(1) 以 N,O-雙三甲基矽氧基三氟乙醯胺 (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, BSTFA) 作為矽化劑，加入吡啶或二甲基甲醯胺 (Dimethylformamide, DMF)，加熱到 70°C，並停留 15 分鐘；(2) 以 BSTFA 加上 1% 之三甲基氯矽烷 (Trimethylchlorosilane, TMS) 作為矽化劑，加入吡啶，於室溫下反應 15 分鐘；(3) 以 MSTFA 作為矽化劑，加入吡啶，於室溫下反應 15 分鐘；(4) 以 MSTFA 作為矽化劑，加熱到 70°C，並停留 15 分鐘；本研究係採用其中之第三種條件，使單酸甘油酯之矽化程度達 98%，雙酸甘油酯與游離甘油酯達 100%，且因加入吡啶作為催化劑，故無須加熱即可完成矽化反應。至於是否完成矽化反應，該研究也提出可以將 1,2,4-丁三醇當作指標，若矽化程度不完整，則層析圖上對應於 1,2,4-丁三

醇之峰將出現出岔且峰高急遽變小。在氣相層析結果之定性分析部分，以三葵酸甘油酯與 1,2,4-丁三醇作為內標之 RME 層析圖顯示，游離甘油與 1,2,4-丁三醇在管柱溫度低於 100°C 時即率先溶出 (Elute)，且單酸甘油酯、雙酸甘油酯與三酸甘油酯在 5% 苯基聚二甲基矽氧烷 (5% phenyl polydimethyl siloxane) 上可依其含碳量清楚地分離；其中，單酸甘油酯中相對於三葵酸甘油酯 ($t_r=19.7$ min) 之相對滯留時間 (Relative retention time, RRT) 為 0.78 之部分，主要為碳數 16，但雙鍵數不等之單油酸甘油酯 (Monoolein)、單亞麻油酸甘油酯 (Monolinolein) 與單次麻油酸甘油酯 (Monolinolenin)，其他可鑑定者還包括單棕櫚油酸甘油酯 (Monopalmitin) (CN=16; RRT=0.70)、單硬脂酸甘油酯 (Monostearin) (CN=18; RRT=0.79)；雙酸甘油酯部分相對於三葵酸甘油酯之相對滯留時間主要從 1.09 ($t_r=21.4$ min) ~ 1.17 ($t_r=23.0$ min)，相對之碳數為 34、36 與 38；三酸甘油酯部分相對於三葵酸甘油酯之相對滯留時間主要從 1.35 ($t_r=26.6$ min) ~ 1.47 ($t_r=29.2$ min)，相對之碳數為 52、54 與 56。在測量化分析前之校正部分，將五種不同濃度之標準溶分別進行 3 次之氣相層析，測定個別成分之峰面積 (Peak area) A_c 與三葵酸甘油酯之峰面積 A_{st} ，並建立面積比 (A_c/A_{st}) 與重量比 (W_c/W_{st}) 之校正曲線，結果顯示除了三油酸甘油酯在濃度低於 5 $\mu\text{g/ml}$ 下，呈現非線性外，其餘成分之面積比與重量比在測定之濃度範圍內皆呈現線性關係。在待測物之定量分析部分，該研究先採用同一待測物樣品採連續注射方式進行七次之層析，測定游離甘油、單酸甘油酯、雙酸甘油酯與三酸甘油酯含量，再於同一 RME 樣品下取樣七次，分別測定游離甘油、單酸甘油酯、雙酸甘油酯與三酸甘油酯含量，以檢驗研究方法之重複性 (Reproducibility)，發現本研究所使用之方法重複性很高，具有測定結果信賴度高、樣品製備程序簡單與分析時間較短等優點。

臺灣國家標準中關於 B-100 生質柴油游離甘油與總甘油含量之測定法 (CNS15018)，係為以氣相層析法測定生質柴油 (甲基酯 B-100) 之游離甘油 (0.005~0.5 mass %) 與總甘油 (0.05~0.5 mass %) 之方法，惟該測定法並不適用於由月桂油類 (Lauric oil) (如椰子油、棕櫚仁油等) 所得之甲基酯類。該方法先分別取 25mg 之甘油 (Glycerol)、50 mg 之單油酸甘油酯 (Monoolein)、50 mg 之雙油酸甘油酯 (Diolein)、50 mg 之三油酸甘油酯 (Triolein)、25 mg 之 1,2,4-丁三醇 (1,2,4-butanetriol) 與 80 mg 之三葵酸甘油酯 (Tricaprin)，於定量瓶中以吡啶 (Pyridine) 分別稀釋到 50、10、10、10、25、10 ml，作為校正用標準品，再以微升注射器取出定量之校正用標準品，注入 10 ml 有墊片 (聚四氟乙烯塗層) 之螺旋蓋式樣品瓶中，以製備 5 種不同濃度之標準溶液，再各加入 100 μl 之 N-甲基-N-三甲基矽氧基三氟乙醯胺 (N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide; MSTFA)，旋緊樣品瓶且振搖混合，並在室溫下靜置 15~20 分鐘，再加入約 8ml 之正庚烷 (n-heptane) 且振搖混合，以進行矽化反應；其中，丁三醇與三葵酸甘油酯為測定用之內標準品 (簡稱內標)。待測樣品之製備，係直接秤取約 100 mg 之生質柴油 (甲基酯 B-100) 樣品，注入 10 ml 有墊片之螺旋蓋式樣品瓶中，再使用微升注射器精確地加入各 100 μl 之丁三醇、三葵酸甘油酯與 MSTFA，旋緊樣品瓶且振搖混合，並在室溫下靜置 15~20 分鐘，再加入約 8ml 之正庚烷且振搖混合。氣相層析方面，使用之氣相層析儀配置火焰離子化偵測器 (Flame ionization detector; FID) 與冷柱頭注射埠 (Cold on-column injector)，而搭配之管柱內壁塗佈 5% 苯基聚二甲基矽

氧烷 (5% phenyl polydimethyl siloxane)，管柱長度 10~15 m，內徑為 0.32 mm，膜厚為 0.1 μm ，使用溫度上限至少為 400°C，並使用一支長 2~5m，內徑 0.53 mm 之高溫保護管柱安裝在注射器後再承接分析管柱；層析條件包括：管柱初溫為 50°C，經過 1 分鐘之恆溫停留後，先以 15°C/min 之升溫速度加熱至 180°C，再以 7°C/min 之升溫速度加熱至 230°C，最後以 30°C/min 之升溫速度加熱至 380°C，並停留 10 分鐘；載氣為氫氣或氮氣，氣體流量為 3 ml/min (於 50°C 量測)；FID 溫度為 380°C。在待測樣品測定方面，先利用甘油、單油酸甘油酯、雙油酸甘油酯、三油酸甘油酯等四種參比物與丁三醇、三葵酸甘油酯等二種內標製備之標準溶液，於既定之層析條件下，使用自動取樣器，取 1 μl 之標準溶液注入冷柱頭注射埠並開始氣相層析，由獲得之層析圖與波峰積分報告，對每一種參比物計算回應比率 rsp_i 與質量比率 amt_i ：

$$\text{rsp}_i = A_i / A_s$$

$$\text{amt}_i = W_i / W_s$$

其中， A_i ：參比物波峰面積

A_s ：內標物波峰面積

W_i ：參比物質量

W_s ：內標物質量

再繪製每一參比物之校正曲線，並計算每一參比物之校正公式：

$$W_x / W_{is} = a_x \times A_x / A_{is} + b_x$$

其中， W_x ：參比物質量

W_{is} ：內標物質量

A_x ：參比物波峰面積

A_{is} ：內標物波峰面積

a_x ：校正公式斜率

b_x ：校正公式截距

校正後，於相同之層析條件下，使用自動取樣器，取 1 μl 之待測樣品注入冷柱頭注射埠並開始氣相層析，先以獲得之層析圖與內標之相對滯留時間 (Relative retention time, RRT) 比較，進行波峰鑑定，再由波峰積分報告與校正公式計算每一成分之質量。在波峰

鑑定方面，游離甘油與 1,2,4-丁三醇（內標）率先溶出，且前者相對於後者之相對滯留時間為 0.85，單酸甘油酯由 4 個重疊波峰所組成，相當於單軟脂酸甘油酯（即棕櫚油酸甘油酯，Monopalmitin）、單油酸甘油酯（Monoolein）、單亞麻油酸甘油酯（Monolinolein）、單次麻油酸甘油酯（Monolinolenin）與單硬脂酸甘油酯（Monostearin），相對於三葵酸甘油酯之 RRT 分別為 0.76、0.83~0.86；雙酸甘油酯部分亦依碳數來區分，但由於分子中雙鍵之變化，波峰之基線無法解析，相對於三葵酸甘油酯之 RRT 為 1.05~1.09，相對之碳數為 34、36 與 38；三酸甘油酯部分相對於三葵酸甘油酯之 RRT 為 1.16~1.31，相對之碳數為 52、54、56、58。至於每一成分之質量計算，則使用校正公式之斜率與截距來計算：

$$\text{甘油百分比 } G = (a_g \times A_g / A_{is1} + b_g) \times W_{is1} \times 100 / W$$

其中，G：待測樣品中甘油質量百分比

A_g ：甘油波峰面積

A_{is1} ：內標 1 之波峰面積

W_{is1} ：內標 1 之質量

W：待測樣品質量率

a_g 、 b_g ：校正公式之斜率與截距

$$\text{個別甘油酯百分比 } G_i = (a_{01} \times A_{gli} / A_{is2} + b_{01}) \times W_{is2} \times 100 / W$$

其中， G_i ：待測樣品中個別甘油酯質量百分比

A_{gli} ：個別甘油酯波峰面積

A_{is2} ：內標 2 之波峰面積

W_{is2} ：內標 2 之質量

W：待測樣品質量率

a_{01} 、 b_{01} ：校正公式之斜率與截距

總甘油 = 游離甘油 + 鍵結甘油（Bound glycerol）（個別甘油酯脂和）