

doi:10.15199/48.2022.12.07

Szacowanie niepewności pomiaru stężenia etanolu w procesie fermentacji piwnej metodą chromatografii gazowej z detektorem FID

Streszczenie. W artykule przedstawiono i przedyskutowano wyniki pomiarów stężenia etanolu w zakresie odpowiadającym typowym stężeniu występującym podczas procesu fermentacji piwnej. Zastosowana aparatura to chromatograf gazowy Varian CP-3800 z kolumną kapilarną i detektorem FID. Wzorcowanie chromatografu przeprowadzono z zastosowaniem metody wzorca wewnętrznego. Wyznaczono i przeanalizowano krzywe wzorcowe w zakresie stężeń etanolu 0-10 % obj., na podstawie przedziałów ufności wyznaczonych dla krzywych wzorcowych wyciągnięto wnioski dotyczące możliwości do uzyskania dokładności pomiaru

Abstract. The article presents and discusses the results of measurements of ethanol concentration in the range corresponding to the typical concentrations occurring during beer fermentation processes. The apparatus used is a Varian CP-3800 gas chromatograph with a capillary column and a FID detector. The chromatograph was calibrated using the internal standard method. Standard curves in the range of ethanol concentrations 0-10% vol. were determined and analyzed, on the basis of the confidence intervals determined for the calibration curves, conclusions were drawn about a possible accuracy of the measurement. (*Estimation of measurement uncertainty of ethanol concentration in beer fermentation process by gas chromatography with FID detector*)

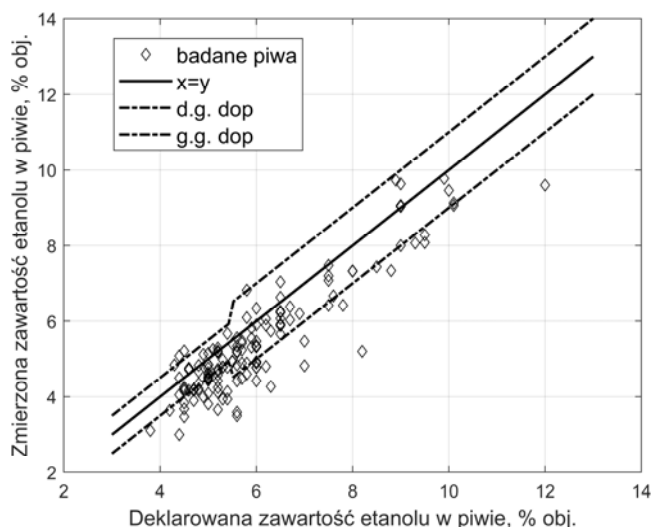
Słowa kluczowe: chromatografia gazowa, FID, krzywa wzorcowa, niepewność pomiaru, zawartość etanolu w piwie.

Keywords: gas chromatography, FID, calibration curve, measurement uncertainty, ethanol content in beer.

Wstęp

Właściwe przeprowadzenie procesu fermentacji etanolowej jest jednym z najistotniejszych etapów produkcji piwa. W trakcie procesu fermentacji piwnej zachodzi konieczność monitorowania stężenia różnych składników powstających w brzeczce piwnej takich jak na przykład alkohole, kwasy tłuszczowe, estry i inne [1], [2]. Jednym z najważniejszych składników jest stężenie etanolu, którego wartość pod koniec procesu fermentacji zwykle osiąga 5-6% stężenia objętościowego, na ogół nie przekraczając 10% w zależności od gatunku piwa. Wyznaczenie stężenia etanolu w trakcie trwania procesu fermentacji jest niezbędnym etapem w syntezy modelu matematycznego tego procesu [3]. Uzyskany model można wykorzystać do wyznaczenia optymalnej strategii sterowania procesem fermentacji [4]. Dokładne wyznaczanie tego stężenia ma również znaczenie prawne. W [5] określono zakresy dopuszczalnych odchyłek dodatnich lub ujemnych dozwolonych w odniesieniu do oznaczania objętościowej zawartości alkoholu w piwach, w wartościach bezwzględnych. Dla piw o zawartości alkoholu nieprzekraczającej 5,5% objętości dopuszczalnie bezwzględne odchylenie od wartości prawdziwej może wynieść $\pm 0,5\%$ obj., natomiast dla piw o zawartości alkoholu przekraczającej 5,5% objętości odpowiednio $\pm 1\%$ objętości. Jedną z metod najczęściej stosowanych do wyznaczania stężenia etanolu w piwie jest pomiar metodą chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo – jonizacyjnym (FID), a do wyznaczania krzywej wzorcowej stosuje się metodę wzorca wewnętrznego [6], [7]. Metody chromatograficzne pomiaru charakteryzuje się najczęściej takimi parametrami jak precyzja, dokładność (niepewność pomiaru), liniowość oraz limit detekcji i kwantyfikacji. W [8] przedstawiono ciekawe wyniki badania zawartości alkoholu w ponad stu rodzajach piwa dostępnych na polskim rynku. Badania autorów wykazały, że w piwach dostępnych na rynku rzeczywiste zawartości alkoholu są na ogół zaniżone względem wartości podanych na etykietach butelek, w niektórych przypadkach bardzo znacząco. Wyniki autorów dotyczące piwa przedstawiono w postaci graficznej na rysunku 1. Autorzy deklarują, że krzywa kalibracyjna uzyskana metodą wzorca wewnętrznego jest liniowa w

zakresie od 0,01 - 20,0% ze współczynnikiem determinacji R^2 równym 0.999 [9], a precyzję i dokładność względną szacują na lepszą niż 5%, aczkolwiek w artykule nie zaprezentowano krzywej wzorcowej wraz z jej przedziałami ufności.



Rys.1. Wyniki pomiaru zawartości etanolu w 137 różnych piwach sprzedawanych w Polsce, na podstawie danych z [8]; d.g. dop, g.g. dop – dolna i górna granica dopuszczalna odchylenia zawartości etanolu w piwach od wartości na etykiecie wg [5]

Generalnie w literaturze dotyczącej wyznaczania zawartości etanolu i innych składników lotnych w piwie metodą chromatografii gazowej z detektorem FID zakłada się liniowość charakterystyki wzorcowej, a jakość uzyskanej krzywej wzorcowej określa się najczęściej poprzez podanie wartości współczynnika determinacji R^2 . Takie podejście może być niewystarczające, gdyż na skutek różnych czynników model krzywej wzorcowej w postaci wielomianu pierwszego stopnia może okazać się jedynie przybliżeniem, a modelowanie krzywej wzorcowej wielomianem wyższego niż pierwszy stopień może prowadzić do lepszych rezultatów w sensie zmniejszenia niepewności pomiaru.

Metoda wzorca wewnętrznego

W chromatografii metoda wzorca wewnętrznego jest zalecana do przeprowadzania analiz ilościowych, gdy wymagana jest wysoka dokładność. Wzorzec wewnętrzny stanowi substancja nie występująca w analizowanej mieszaninie i dająca osobny pik na chromatogramie. Wzorcowanie dla składnika x w tej metodzie polega na wykonaniu chromatogramów mieszanin zawierających znane ilości oznaczanego składnika x oraz znane ilości wzorca wewnętrznego is . Ponieważ na chromatogramie powierzchnia każdego pików jest proporcjonalna do ilości odpowiadającego mu składnika w mieszaninie oraz współczynnika odpowiedzi detektora na ten składnik, to dla składnika x mieszaniny oraz dla wzorca wewnętrznego is zachodzi:

$$(1) \quad A_x = D_x \cdot C_x, A_{is} = D_{is} \cdot C_{is},$$

gdzie A_x , A_{is} – powierzchnie pików dla składników x i is , D_x i D_{is} – współczynniki odpowiedzi detektora, C_x i C_{is} – stężenia składników x i is w mieszaninie. Wobec tego stosunek powierzchni pików składnika x i wzorca wewnętrznego is można wyrazić jako:

$$(2) \quad \frac{A_x}{A_{is}} = \frac{D_x}{D_{is}} \cdot \frac{C_x}{C_{is}} = k \cdot \frac{C_x}{C_{is}}$$

Przy założeniu, że wartości współczynników odpowiedzi detektora na poszczególne składniki mieszaniny nie zależą od stężenia i są stałe, otrzymuje się zależność liniową pomiędzy ilorazem powierzchni pików składników x i is , a stałą k można wyznaczyć, dokonując pomiaru powierzchni pików dla mieszaniny wzorcowej o znanej zawartości składników x i is . W przypadku wykonania chromatogramów dla różnych znanych stosunków stężeń C_x i C_{is} punkty zależności (2) teoretycznie ułożą się na prostej przechodzącej przez początek układu współrzędnych, o nachyleniu k . Punkty te w ogólności wyznaczają krzywą kalibracyjną:

$$(3) \quad \frac{A_x}{A_{is}} = f\left(\frac{C_x}{C_{is}}\right)$$

Poprzez eksperyment chromatograficzny można dla mieszaniny o nieznannej zawartości składnika x wyznaczyć lewą stronę równania (3), a na podstawie krzywej kalibracyjnej f odtworzyć stosunek stężeń x i is w mieszaninie. Ponieważ stężenie wzorca wewnętrznego jest znane, natychmiast można wyliczyć stężenie składnika x .

Stanowisko pomiarowe

Pomiary w celu wyznaczenia krzywych kalibracyjnych dla etanolu metodą wzorca wewnętrznego (jako wzorca wewnętrznego użyto 1-butanol) przeprowadzono na stanowisku chromatografu gazowego Varian CP-3800 wyposażonego w detektor FID i kapilarną kolumnę chromatograficzną CP-Sil 5CB o długości 25 i średnicy wewnętrznej 0,53 mm. Temperatury dozwornika i detektora podczas analiz wynosiły 200°C, a temperatura kolumny 50°C. Objętości nstrzyków badanych próbek wynosiły 0,2μl. Próbkowania sygnału napięciowego detektora FID dokonywano z częstotliwością 40 Hz i rozdzielczością 1 μV. Do detekcji i wyznaczenia powierzchni pików na chromatogramach zastosowano oprogramowanie STAR Workstation dedykowane dla chromatografu Varian. Wygląd chromatografu przedstawiono na rysunku 2.

Eksperymenty i wyniki

W okresie jednego tygodnia przeprowadzono trzy eksperymenty kalibracyjne według poniższego opisu. Eksperyment 1 był podstawowy, wyznaczano krzywą

kalibracyjną w zakresie stężeń etanolu 1,92% - 9,60% objętościowo. Eksperymenty 2 i 3 stanowią uzupełnienie eksperymentu 1, odpowiednio dla mniejszych wartości stężeń etanolu niż dla eksperymentu 1 oraz dla wartości pomiędzy wartościami eksperymentu 1.



Rys.2. Chromatograf gazowy Varian CP-3800

Eksperyment 1 (E1)

W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej dla etanolu przygotowano pięć roztworów wodnych etanolu o objętości 10 ml i zawartościach etanolu 1,92%, 3,84%, 5,76%, 7,68%, 9,60%. Do wykonania wodnych roztworów etanolu wykorzystano wodę destylowaną oraz alkohol etylowy (cz.d.a., 96% obj., POCH). Jako wzorzec wewnętrzny zastosowano wodny roztwór 1-butanolu (cz.d.a., 99,8% obj., POCH) o stężeniu 0,998% objętościowo. Stężenie butanolu we wszystkich próbkach wzorcowych było jednakowe. Próbkę wzorcową dla metody wzorca wewnętrznego przygotowano dodając osobno po 0,5 ml każdego z pięciu roztworów etanolu do 5 ml przygotowanego roztworu butanolu. Każdą próbkę chromatografowano kilkakrotnie. Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wyniki wzorcowania metodą wzorca wewnętrznego dla eksperymentu 1 (E1)

Stężenie etanolu, % obj.	Liczba pomiarów	A_{et}/A_{but} (średnia)	A_{et}/A_{but} (std)	A_{et}/A_{but} (std wzgl.) %
1,92	3	1,1080	0,0012	1,12
3,84	3	2,2336	0,0021	0,90
5,76	4	0,3739	0,0040	1,07
7,68	3	0,5161	0,0045	0,87
9,60	4	0,6461	0,0102	1,59

Eksperyment 2 (E2)

Badano wzorce dla małych stężeń etanolu. Eksperyment został przeprowadzony trzy dni po pierwszym i stanowi uzupełnienie eksperymentu 1. Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Wyniki wzorcowania metodą wzorca wewnętrznego dla eksperymentu 2 (E2)

Stężenie etanolu, % obj.	Liczba pomiarów	A_{et}/A_{but} (średnia)	A_{et}/A_{but} (std)	A_{et}/A_{but} (std wzgl.) %
0,06	5	0,0025	0,000055	2,25
0,12	5	0,0051	0,00022	4,32
0,24	5	0,0102	0,00021	2,05
0,48	5	0,0222	0,00072	3,23

Wzorce przygotowano podobnie, jak poprzednio, przy czym wartości stężeń etanolu w próbkach wzorcowych wynosiły: 0,06%, 0,12%, 0,24%, 0,48% objętościowo.

Eksperyment 3 (E3)

Badania wykonano cztery dni po eksperymencie 2. Chromatografowano mieszaniny wzorcowe o zawartości etanolu 0,96%, 2,88%, 4,80%, 6,72%, 8,64% objętościowo. Próbkę przygotowano w ten sam sposób, jak w poprzednich eksperymentach. Wyniki eksperymentu 3 przedstawiono w tabeli 3.

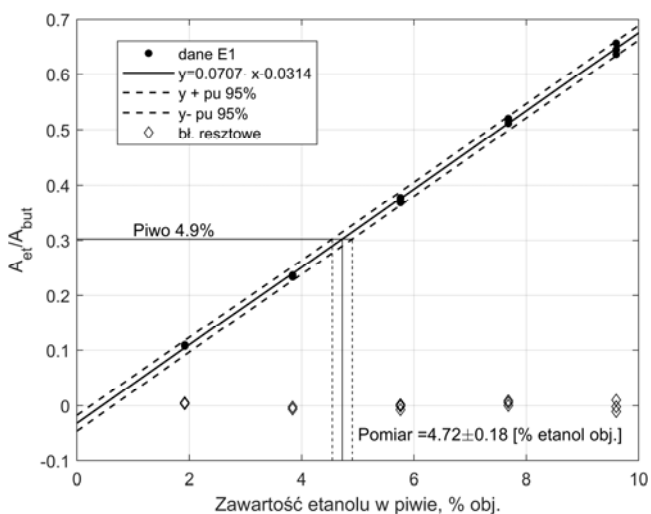
Tabela 3. Wyniki wzorcowania metodą wzorca wewnętrznego dla eksperymentu 3 (E3)

Stężenie etanolu, % obj.	Liczba pomiarów	A_{et}/A_{but} (średnia)	A_{et}/A_{but} (std)	A_{et}/A_{but} (std wzgl.) %
0,96	5	0,0477	0,00060	1,26
2,88	4	0,1653	0,0011	0,65
4,80	5	0,3064	0,0132	4,32
6,72	4	0,4391	0,0033	0,76
8,64	3	0,5808	0,0014	0,24

Dla danych E3 i stężenia etanolu równego 4,80% obj. otrzymano znacznie większy rozrzut wyników, niż w pozostałych przypadkach, aczkolwiek średnia pozostaje w ogólnym trendzie. Przyczyn tego zjawiska autorzy nie potrafili wyjaśnić.

Dyskusja wyników

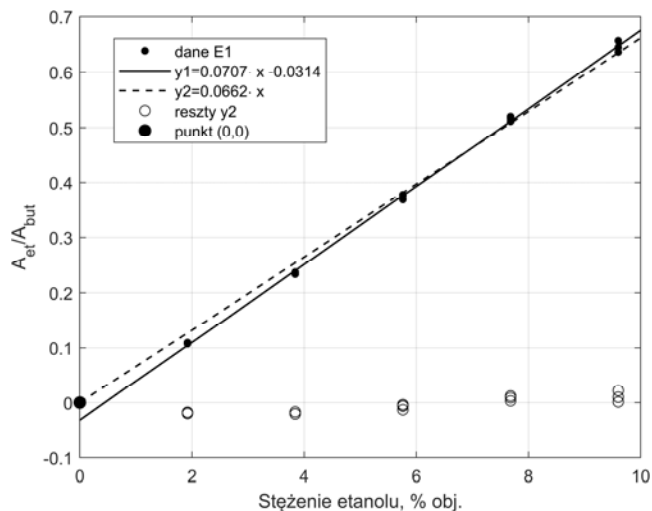
Dla danych z tabeli 1 wyznaczono krzywą wzorcową wraz przedziałami ufności (przyjęto poziom ufności równy 95%, podobnie we wszystkich pozostałych przypadkach). Wyniki przedstawiono na rysunku 3.



Rys.3. Krzywa wzorcowania chromatografu na podstawie wyników eksperymentu 1 oraz szacunkowy wynik pomiaru dla piwa z etykietą 4,9% zawartości etanolu

Dla wygody oś x wyskalowano w % obj. zawartości etanolu, na osi y przedstawiono stosunek powierzchni pików etanolu do powierzchni pików butanolu. Prostą regresji opisującą związek pomiędzy stężeniem etanolu, a stosunkiem powierzchni pików etanolu i pików butanolu (wzorzec wewnętrzny) wykreślono w przedziale od 0 do 10% zawartości objętościowej etanolu, nieco esktrapolując wyniki poza przedział wartości zastosowanych wzorców, dla celów interpretacji. Punkty rozłożone wokół wartości $y=0$ przedstawiają wartości wyznaczonych błędów resztowych. Na wykresie krzywej wzorcowej z rysunku 3 odczytano wynik pojedynczego pomiaru stężenia piwa (etykieta zawiera informację o stężeniu etanolu równym 4,9% objętościowo), który uzyskano dodając do piwa wzorzec z butanolem użyty przy eksperymentach 1-3. Otrzymana

wartość ilorazu powierzchni pików etanolu do pików butanolu wyniosła 0,3025. Na podstawie krzywej wzorcowej i jej przedziałów ufności wynik pomiaru stężenia etanolu wyniósł $4,72 \pm 0,18$ % obj. Dokładność względna pomiaru wynosi 3,8%.

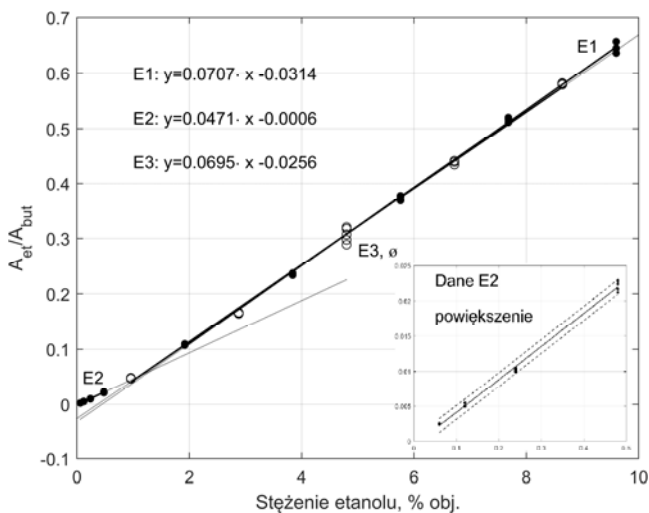


Rys.4. Porównanie modeli liniowych krzywej wzorcowej, z wyrazem wolnym i bez wyrazu wolnego dla danych E1

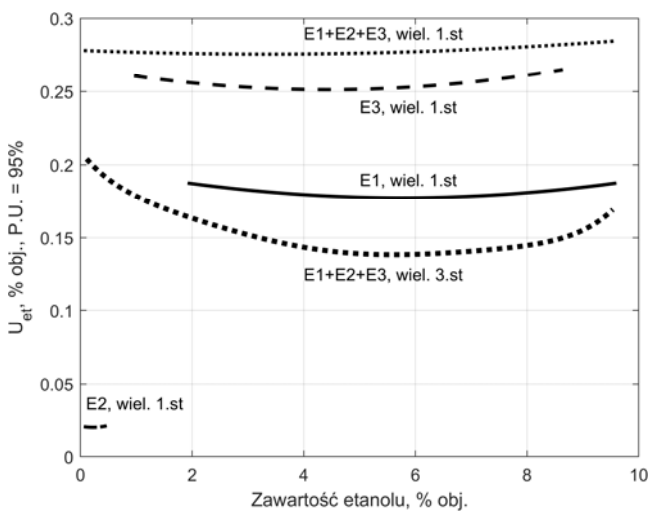
Równanie krzywej kalibracji ma postać $y=0,0707x-0,0314$, co oznacza, że krzywa wzorcowa nie przechodzi przez punkt (0,0), przez który wg równania (2) powinna przechodzić. Krzywa wzorcowa przecina oś y w punkcie 0,44% zawartości objętościowej etanolu. Na rysunku 4 porównano krzywe wzorcowe (dane E1) dla modelu liniowego z wyrazem wolnym oraz dla modelu bez wyrazu wolnego, wg wzoru (2). Analiza przebiegu reszt dla modelu y_2 (wymuszony wyraz wolny równy 0) pokazuje nieadekwatność tego modelu dla danych E1 – w resztach widoczny jest wyraźny trend. Na wykresie dodano punkt (0,0) odpowiadający odpowiedzi chromatografu wg wzoru (2) dla zerowego stężenia etanolu.

Na rysunku 5 przedstawiono razem dane E1, E2 i E3 oraz ich liniowe krzywe wzorcowania wraz z wartościami współczynników ich równań. Widać, że liniowe krzywe wzorcowania dla danych E1 i E3 (kółka) są zgodne, aczkolwiek nachylenie krzywej dla danych E3 jest nieco mniejsze, a wyraz wolny również ma mniejszą wartość. W przypadku danych E2 krzywa wzorcowa zmienia charakter – ma istotnie mniejsze nachylenie w porównaniu do krzywych dla danych E1 i E3, a wyraz wolny jest bliski 0 (zgodnie z równaniem (2)). Sumaryczna krzywa wzorcowania z danych E1 + E2 + E3 ma charakter nieliniowy względem zmiennej niezależnej i należy ją modelować wielomianem wyższego stopnia. Przeprowadzone próby pokazały, że najlepsze wyniki daje w tym przypadku krzywa wzorcowa w postaci wielomianu trzeciego stopnia. Zwiększanie stopnia wielomianu powyżej 3 nie przynosi znaczących korzyści.

Na rysunku 6 przedstawiono charakterystyki metrologiczne chromatografu wzorcowanego do pomiaru stężenia etanolu metodą wzorca wewnętrznego dla wariantów krzywych wzorcowania wyznaczanych na podstawie różnych zestawów danych E1, E2 i E3 przy aproksymacji wielomianem pierwszego stopnia, a w jednym przypadku wielomianem trzeciego stopnia. Oś odciętych obejmuje zakres pomiarowy stężenia objętościowego etanolu, dla którego przeprowadzono badania i wzorcowania, na osi rzędnych przedstawiono bezwzględną niepewność rozszerzoną pomiaru obliczoną przy poziomie ufności 95%.



Rys.5. Liniiowe krzywe kalibracyjne dla zestawów danych E1, E2 i E3



Rys.6. Niepewność rozszerzona pomiaru stężenia etanolu dla krzywych wzorcowania wyznaczonych dla różnych zestawów danych i stopni wielomianu

Najmniejszą niepewność rozszerzoną w zakresie pomiarowym 0,5% - 9,6% obj. etanolu uzyskano, gdy krzywą wzorcowania wyznaczono na podstawie wszystkich zestawów danych, a stopień wielomianu aproksymującego dane wynosił 3. W środku zakresu pomiarowego, między 5 a 6 % obj. etanolu niepewność rozszerzona pomiaru jest w tym przypadku mniejsza niż 0,14% obj. etanolu. Dla małych stężeń etanolu, w zakresie 0,06 % - 0,48% najlepszą dokładność bezwzględną pomiaru osiąga się dla zestawu danych E2 – niepewność rozszerzona wyniku pomiaru stężenia etanolu nie przekracza w tym przypadku wartości 0,022% obj.

Podsumowanie i wnioski

Badania przeprowadzone w artykule pokazały, że sposób wyznaczania krzywej wzorcowania i plan eksperymentu mają bardzo duże znaczenie dla dokładności uzyskiwanych rezultatów. Założenie o liniowości chromatograficznej krzywej wzorcowej, często przyjmowane, gdy stosuje się detektor FID i metodę wzorca

wewnętrzny, należy starannie weryfikować, gdyż rzeczywista charakterystyka może okazać się nieliniowa, zwłaszcza w zakresie małych stężeń. Faktem jest, że dokładne wyznaczenie krzywej wzorcowania w przypadku chromatografii gazowej z kolumną kapilarną może być kosztowne, zwłaszcza czasowo - czas pojedynczego pomiaru może być rzędu 10 minut, a więc czas wykonania samych pomiarów przedstawionych w artykule to $58 \times 10 = 580$ minut. Czas ten można znacząco skrócić, jeżeli znana jest przybliżona wartość spodziewanego pomiaru stężenia. Wówczas, można wykonać kalibrację dwupunktową z dwoma wzorcami o wartościach ograniczających spodziewane wyniki z góry i z dołu.

Przy wyznaczaniu krzywych kalibracyjnych i niepewności pomiaru pokazanych w artykule założono, że niepewność stężeń przygotowanych mieszanin wzorcowych wykorzystywanych do kalibracji jest pomijalnie mała. W praktyce przy poprawnym i starannym przygotowaniu wzorców ich niepewność jest niewielka w porównaniu do innych źródeł niepewności i nie wpływa istotnie na wartości niepewności pokazane w artykule.

Autorzy: dr inż. Witold Ilewicz, Politechnika Śląska, Katedra Pomiarów i Systemów Sterowania, ul. Akademicka 16, 44-100 Gliwice, E-mail: Witold.Ilewicz@polsl.pl; dr hab. inż. Piotr Skupin, Politechnika Śląska, Katedra Automatyki i Robotyki, ul. Akademicka 16, 44-100 Gliwice, E-mail: Piotr.Skupin@polsl.pl; inż. Karolina Szotek, E-mail: k-szotek@wp.pl

LITERATURA

- [1] Kucharczyk, K., & Tuszyński, T. (2017). The effect of wort aeration on fermentation, maturation and volatile components of beer produced on an industrial scale. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(1), 31-38.
- [2] Alves, V., Gonçalves, J., Figueira, J. A., Ornelas, L. P., Branco, R. N., Câmara, J. S., & Pereira, J. A. (2020). Beer volatile fingerprinting at different brewing steps. *Food chemistry*, 326, 126856.
- [3] de Andrés-Toro, B., Giron-Sierra, J. M., Lopez-Orozco, J. A., Fernandez-Conde, C., Peinado, J. M., & García-Ochoa, F. (1998). A kinetic model for beer production under industrial operational conditions. *Mathematics and Computers in Simulation*, 48(1), 65-74.
- [4] Ramirez, W. F., & Maciejowski, J. (2007). Optimal beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 113(3), 325-333.
- [5] ROZPORZĄDZENIE PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY (UE) NR 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r.
- [6] Charapitsa, S., Sytova, S., Korban, A., Boyarin, N., Shestakovich, I., & Čabala, R. (2018). The establishment of metrological characteristics of the method "Ethanol as Internal Standard" for the direct determination of volatile compounds in alcoholic products. *Journal of Chemical Metrology*, 12(1), 59-69.
- [7] Wang, M. L., Choong, Y. M., Su, N. W., & Lee, M. S. (2003). A rapid method for determination of ethanol in alcoholic beverages using capillary gas chromatography. *Journal of food and Drug Analysis*, 11(2), 3.
- [8] Wachelko, O., Szpot, P., & Zawadzki, M. (2021). The application of headspace gas chromatographic method for the determination of ethyl alcohol in craft beers, wines and soft drinks. *Food Chemistry*, 346, 128924.
- [9] da Costa Fulgêncio, A. C., Resende, G. A. P., Teixeira, M. C. F., Botelho, B. G., & Sena, M. M. (2022). Determination of Alcohol Content in Beers of Different Styles Based on Portable Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration. *Food Analytical Methods*, 15(2), 307-316.