



# Agilent 7696A 样品前处理工作台对样品进行自动化预处理，满足 EN14105:2011 方法：气相色谱分析生物柴油

## 应用简报

燃料

### 作者

James D. McCurry 博士  
安捷伦科技有限公司  
2850 Centerville Rd  
Wilmington, DE  
19808

### 摘要

最新修订的欧盟方法 EN14105 描述了手动制备标样和样品的过程，以对 B100 生物柴油中的甘油污染物进行气相色谱分析，该方法步骤繁琐且复杂。而 Agilent 7696A 样品前处理工作台成功地对该方法中的标样和样品进行了自动化前处理，同时试剂用量和化学废弃物均减少了 10 倍。采用工作台制备的标样校准性能已超过了该方法的指标要求。利用工作台对市售生物柴油样品进行前处理，获得了极高的精度，远远高于方法的性能指标。



**Agilent Technologies**

## 前言

在遵循欧盟法规的国家，B100 生物柴油的质量通过测定燃料中的游离甘油和总甘油以及单脂肪酸甘油酯、二脂肪酸甘油酯和三脂肪酸甘油酯的含量来控制。气相色谱 (GC) 方法 EN14105 可用于分离和定量这些化合物。由于甘油、单脂肪酸甘油酯和二脂肪酸甘油酯都是不挥发的，因此该方法介绍了一种复杂的程序，在 GC 分析前将这些化合物衍生化以生成挥发性的硅烷化物质。2011 年，欧洲标准化委员会 (CEN) 对此方法进行了更新，改善了 GC 性能、甘油酯定量以及整体精度 [1]。本应用简报介绍了使用 Agilent 7696A 样品前处理工作台对校准标样和样品进行自动化前处理，再通过 Agilent 7890A 系列气相色谱系统进行分析。

该工作台是一款专为自动化样品前处理而设计的独立仪器。它采用两个 Agilent 7693A 进样塔，在 2 mL 样品瓶间定量移取液体。装有不同化学资源、标样和样品的样品瓶置于三个 50 位的样品盘上。样品盘配备有机械臂、涡旋混合台板以及样品加热台板。在生物柴油分析中，工作台可成功用于 ASTM 方法 D6584 中样品的前处理，该方法与 EN14105 方法相似 [2]。在相关应用简报中，使用工作台制备的样品所得分析结果与手动制备样品获得的结果一致。

安捷伦工作台更新的最新版本 Easy SamplePrep (ESP) 软件，可以使化学资源和时间得到更有效的利用。作为其核心部分，ESP 提供了一个简单的软件平台，允许用户使用代表工作台各个操作的拖放图标来快速建立样品前处理方法。ESP 中新的“**Batch Mode (批量模式)**”的操作模式，可以让工作台在进行下一个操作前对所有样品重复相同的操作。对于可采用批量模式的方法而言，可以显著提高清洗溶剂和废液的利用率并缩短样品前处理时间 [3,4]。

## 实验部分

### EN14105 校准标样的工作台前处理

工作台在后进样塔处配备有蓝色系列 25  $\mu$ L 气密进样针 (部件号 G4513-80241)，在前进样塔处配备有蓝色系列 500  $\mu$ L 气密进样针 (部件号 G4513-60561)。用于制备标样和样品的化学资源列于表 1 中。用于制备标准甘油酯溶液的三种参考甘油酯纯化合物购于 Nu-Chek Prep ([www.nu-chekprep.com](http://www.nu-chekprep.com))。每种化学资源分别存放在单独的 2 mL 高回收率样品瓶中 (部件号 5183-2030)，使用带 PTFE 内衬隔垫的螺口盖 (部件号 5040-4682) 密封。

表 1. 用于方法 EN14105:2011 的化学资源和标样

资源	说明	供应商
庚烷	毛细管气相色谱级	Sigma Aldrich 部件号 H9629
甘油储备液	0.5 mg/mL 吡啶溶液	Sigma Aldrich 部件号 44892-U
丁三醇溶液	1 mg/mL 吡啶溶液	部件号 5982-0024
MSTFA (N-甲基-N-三甲基硅烷基三氟乙酰胺)	硅烷化试剂	部件号 5190-1407
标准甘油酯溶液	2.5 mg/mL THF 溶液	Nu-Chek Prep
单脂肪酸甘油酯保留时间标样	10 mg/mL 吡啶溶液	部件号 5190-1410
吡啶	无水级	Sigma Aldrich 部件号 270970

利用 Agilent ESP 软件在工作台中对化学资源进行布局并分配初始属性。此资源布局如表 2 所述，并以图示形式显示于图 1 中。

表 2. 用于制备图 1 中所示标样和样品的安捷伦工作台化学资源

资源名称	资源类型	使用类型	用量 (μL)	样品瓶范围
庚烷	化学资源	按体积	1000	81–95
甘油储备液	化学资源	按体积	1000	61
丁三醇溶液	化学资源	按体积	1000	62
MSTFA	化学资源	按体积	1000	63
标准甘油酯溶液	化学资源	按体积	1000	64
单脂肪酸甘油酯保留时间标样	化学资源	按体积	1000	65
吡啶	化学资源	按体积	500	71
空样品瓶				51–55

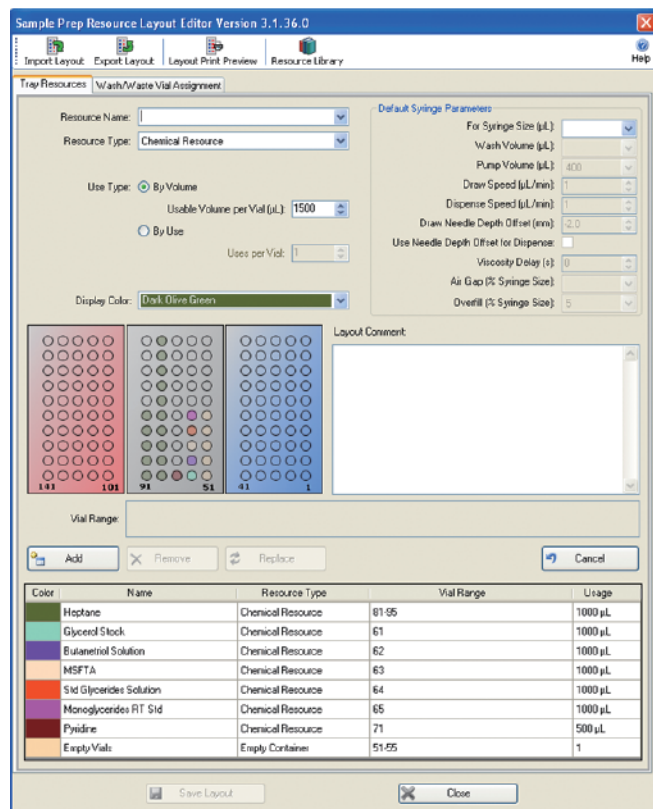


图 1. 用于根据方法 EN14105 制备标样和样品的 Easy Sample Prep (ESP) 软件布局

EN14105 方法要求使用线性稀释法配制五个校准标样。四个标样含有不同含量的甘油以及相同量的内标 1,2,3-丁三醇。第五个校准标样含有三种单脂肪酸甘油酯，通过保留时间对比，定性生物柴油中的这些化合物。EN14105 方法介绍了用于制备大约 10 mL 校准标样的步骤。由于工作台使用 2 mL 样品瓶，因此该方法的自动化所需体积将缩小 10 倍 [2]。表 3 描述了用于制备这五个校准标样的 37 个步骤。因为是线性稀释，批量模式未能用于标样的前处理（图 2）。特别值得注意的是，将参数 Needle Depth Offset（针头深度偏移）设置为 0，同时结合使用高回收率样品瓶，以确保制备这些标样所需的小体积液体完全混合。在分配每个资源时，额外使用 5% 的溢出体积，以消除进样针内可能产生气泡造成的潜在误差。

### EN14105 中 B100 生物柴油样品的工作台前处理

EN14105 方法要求称量 100 mg 生物柴油样品置于反应样品瓶中进行硅烷化。由于工作台的样品制备规模缩小了 10 倍，因此只需称量 10 mg 样品置于 2 mL 高回收率样品瓶中。因为未配备分析天平，在工作台上不能自动进行样品称量。由于称量 10 mg 生物柴油非常困难，因此使用 Eppendorf Reference 可调量程移液器（10–100  $\mu\text{L}$ ）移取样品。通过手动移取 11.5  $\mu\text{L}$  生物柴油置于去皮重的 2 mL 高回收率样品瓶中，并记录精确到 0.01 mg 的重量，从而完成 10 mg 生物柴油的称量。

表 3. 用于根据方法 EN14105 制备校准标样的工作台方法

步骤	工作台操作	说明	进样针	抽取速度 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	推出速度 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	针头深度补偿 (mm)	粘度延迟 (s)	溢出 %
1	清洗	用 5 $\mu\text{L}$ 丁三醇清洗进样针三次	25 $\mu\text{L}$	250	1000		0	
2–6	添加	将 8 $\mu\text{L}$ 丁三醇分别加入 1、2、3、4、5 号空样品瓶中	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0	2	5
7	清洗	用溶剂 A 清洗进样针	25 $\mu\text{L}$	250	1000		0	
8	清洗	用 5 $\mu\text{L}$ 甘油储备液清洗进样针	25 $\mu\text{L}$	250	1000		0	
9	添加	将 1 $\mu\text{L}$ 甘油储备液加入 1 号空样品瓶中	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0	2	5
10	添加	将 4 $\mu\text{L}$ 甘油储备液加入 2 号空样品瓶中	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0	2	5
11	添加	将 7 $\mu\text{L}$ 甘油储备液加入 3 号空样品瓶中	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0	2	5
12	添加	将 10 $\mu\text{L}$ 甘油储备液加入 4 号空样品瓶中	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0	2	5
13	添加	将 5 $\mu\text{L}$ 甘油单油酸酯保留时间标样加入 5 号空样品瓶中	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0	2	5
14	添加	将 20 $\mu\text{L}$ 甘油酯标样加入 5 号空样品瓶中	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0	2	5
15	添加	将 20 $\mu\text{L}$ 吡啶加入 5 号空样品瓶中	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0	2	5
16	清洗	用溶剂 A 清洗进样针三次	25 $\mu\text{L}$	250	1000		0	
17–21	添加	将 15 $\mu\text{L}$ MSTFA 分别加入 1、2、3、4、5 号空样品瓶中	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0	2	5
22–26	混合	将 1、2、3、4、5 号空样品瓶在 2,500 RPM 下混合 15 s						
27	静置	15 min						
28–32	添加	将 800 $\mu\text{L}$ 庚烷分别加入 1、2、3、4、5 号空样品瓶中	500 $\mu\text{L}$	1250	5000	0	2	5
33–37	混合	将 1、2、3、4、5 号空样品瓶在 2,500 RPM 下混合 15 s						

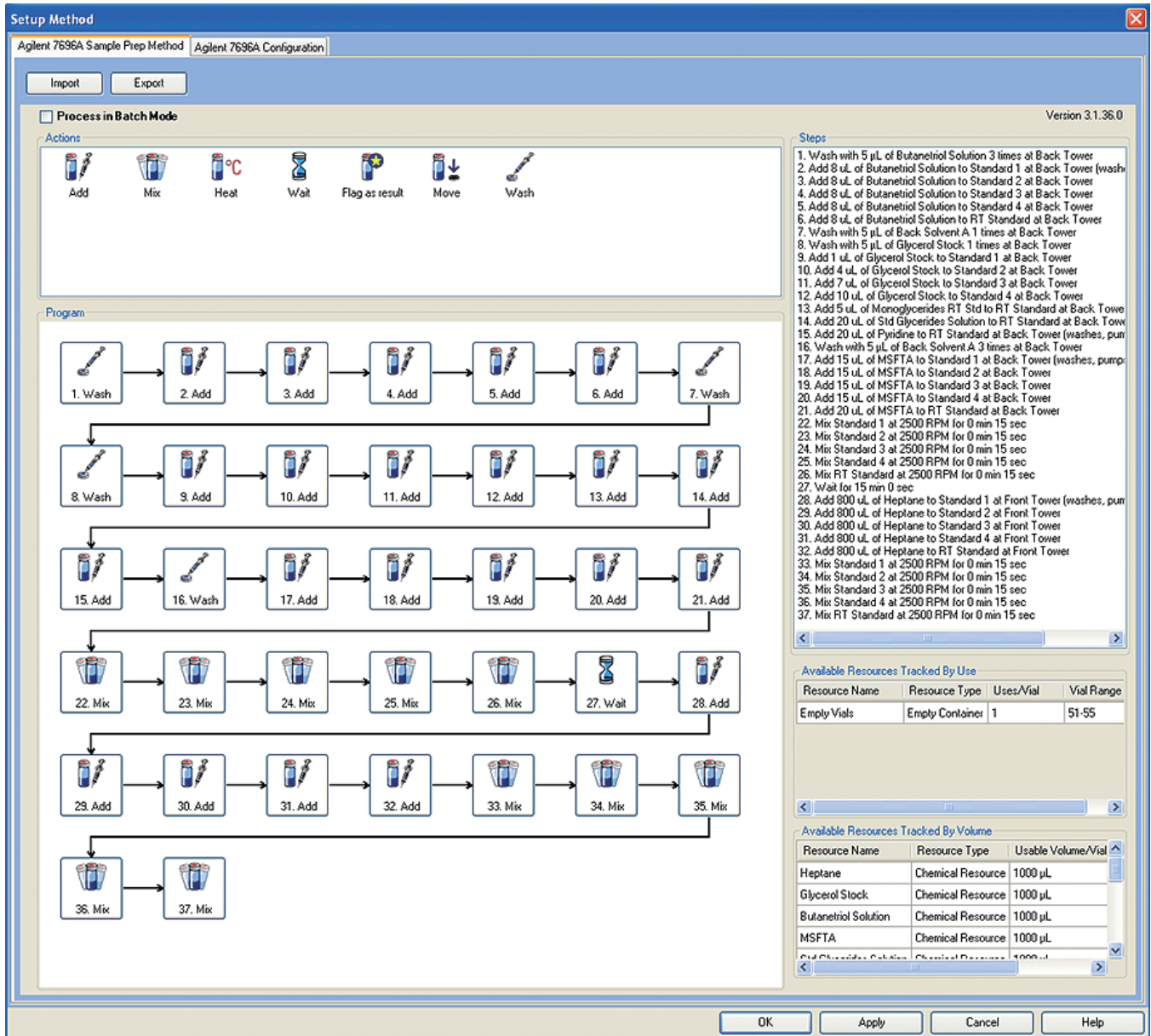


图 2. 用于根据方法 EN14105 制备校准标样的 Easy Sample Prep (ESP) 软件方法

通过向样品中加入固定体积的丁三醇储备液、标准甘油酯储备液、吡啶和 MSTFA，对非挥发性组分进行衍生化，以进行 EN14105 方法中的样品前处理。15 min 后，向混合物中加入庚烷以淬灭反应。由于工作台使用的是 2 mL 样品瓶，每种试剂的加入体积都缩小了 10 倍。此样品前处理过程的每个步骤列于表 4 中。使用 ESP 软件创建批量模式方法进行样品前处理可以同时节约时间和资源。此批量模式方法如图 3 所示。

标样前处理和样品前处理均使用相同的资源布局，因此工作台可以利用 ESP 软件顺序队列同时运行两个方法。在本应用简报中，一共对 10 份大豆油衍生的 B100 生物柴油平行样进行了前处理，以评估工作台样品前处理的精度。

表 4. 工作台用于制备 EN14105 方法中生物柴油样品的十个步骤

步骤	工作台操作	说明	进样针	抽取速度 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	推出速度 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	针头深度偏移 (mm)	粘度延迟 (s)	溢出 %
1	清洗	用 5 $\mu\text{L}$ 丁三醇清洗进样针三次	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0		
2	添加	向每个样品中加入 20 $\mu\text{L}$ 吡啶	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0	2	5
3	添加	向每个样品中加入 8 $\mu\text{L}$ 丁三醇	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0	2	5
4	添加	向每个样品中加入 20 $\mu\text{L}$ 甘油酯标样	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0	2	5
5	添加	向每个样品中加入 20 $\mu\text{L}$ MSTFA	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0	2	5
6	混合	将每个样品在 2500 RPM 下混合 15 s						
7	静置	15 min						
8	清洗	用 200 $\mu\text{L}$ 溶剂 A 清洗进样针一次	25 $\mu\text{L}$	250	1000	0		
9	添加	向每个样品中添加 800 $\mu\text{L}$ 庚烷	500 $\mu\text{L}$	1250	5000	0	2	5
10	混合	将每个样品在 2500 PRPM 下混合 15 s						

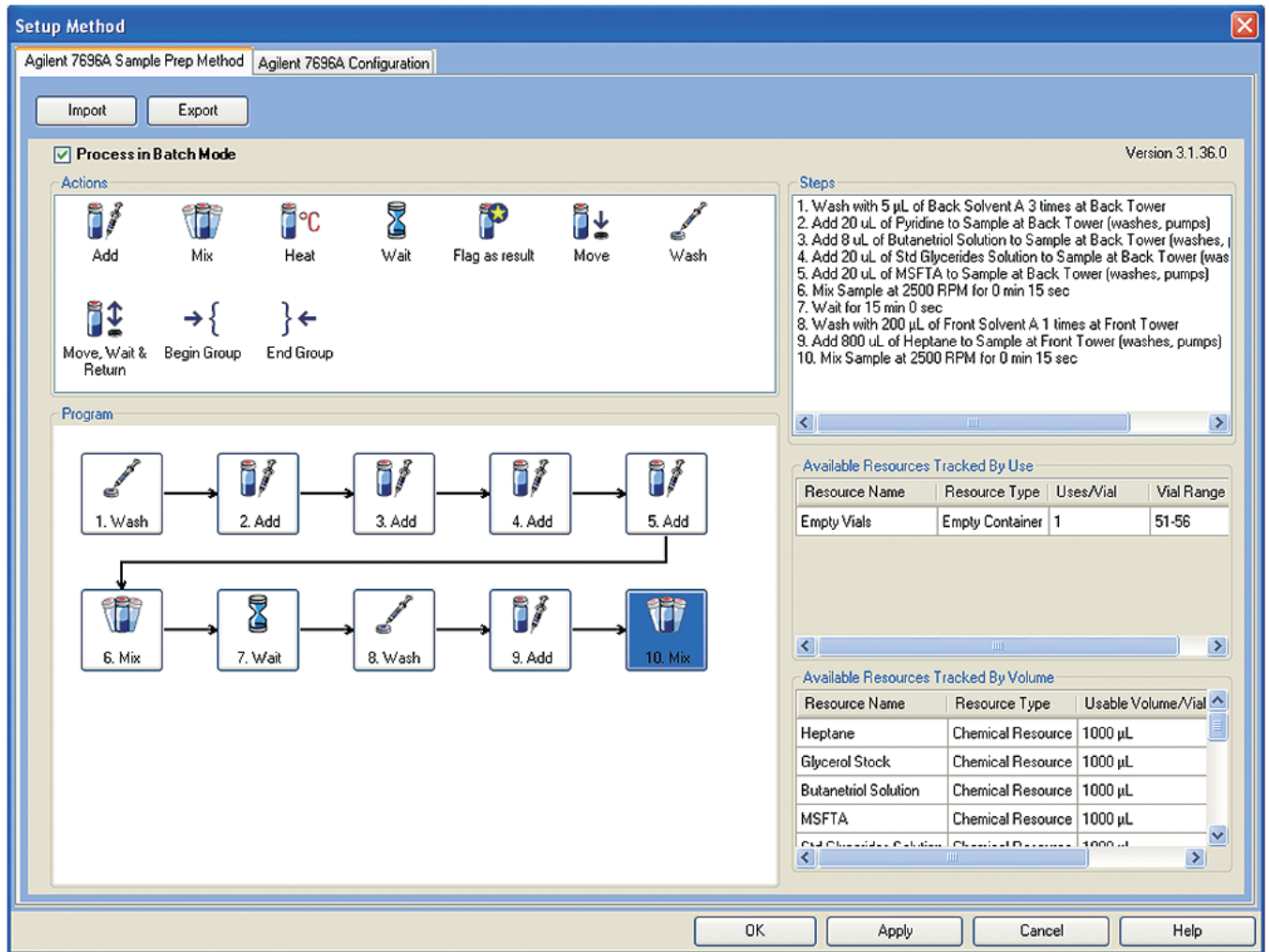


图 3. 用于根据 EN14105 制备生物柴油样品的 Easy Sample Prep (ESP) 软件批量模式方法

## 工作台制备的标样和样品的 GC 分析

按照 EN14105:2011 的要求, 对 Agilent 7890A 气相色谱系统 (GC) 进行配置。表 5 列出了仪器配置和仪器操作条件。在该系统上对每个标样和每个样品进样一次, 进样量为 1  $\mu$ L。使用 Agilent OpenLab CDS ChemStation 控制 7890A 气相色谱系统、采集数据并进行数据分析。

表 5. 根据方法 EN14105:2011 分析工作台制备标样和样品的 Agilent 7890A 气相色谱系统的配置和操作条件

仪器配置	
G3440A	Agilent 7890A 系列气相色谱系统
选件 122	冷柱头进样口, 带 EPC 控制
选件 211	毛细管火焰离子化检测器, 带 EPC 控制
G4513A	Agilent 7693A ALS
色谱柱	用于分析甘油酯的 Select Biodiesel 15 m $\times$ 0.32 mm, 0.1 $\mu$ m 膜厚 (部件号 cp9078)
数据系统	Agilent OpenLab CDS 化学工作站 C.01.03

### GC 操作条件

冷柱头进样口	
初始压力	氮气, 11.353 psi
初始温度	50 $^{\circ}$ C
程序升温	柱箱跟踪模式
色谱柱流速	氮气, 5 mL/min, 恒流
柱温	
初始温度	在 50 $^{\circ}$ C 下保持 1 min
升温速率 1	以 15 $^{\circ}$ C/min 升温至 180 $^{\circ}$ C, 保持 0 min
升温速率 2	以 7 $^{\circ}$ C/min 升温至 230 $^{\circ}$ C, 保持 0 min
升温速率 3	以 10 $^{\circ}$ C/min 升温至 370 $^{\circ}$ C, 保持 10 min
火焰离子化检测器	380 $^{\circ}$ C

## 结果与讨论

### 工作台制备的 EN14105 标样

通过标样的保留时间数据确定三种单脂肪酸甘油酯和甘油酯标样的保留时间。该色谱图示于图 4 中。使用四种甘油校准标样所获

得的数据制作甘油校准曲线。该曲线示于图 5 中。其相关系数为 1.000, 完全满足 EN14105 方法对相关系数优于 0.9 的要求。

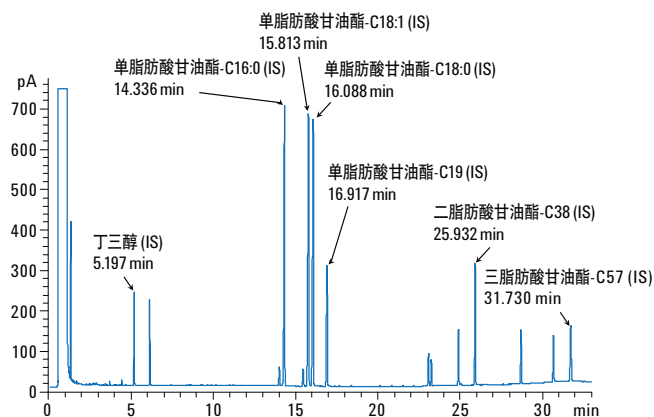


图 4. 使用工作台制备的保留时间鉴定标样。除了加入三种单脂肪酸甘油酯外, 此混合物中还加入了四种内标 (丁三醇、单脂肪酸甘油酯-C19、二脂肪酸甘油酯-C38 和三脂肪酸甘油酯-C57) 溶液

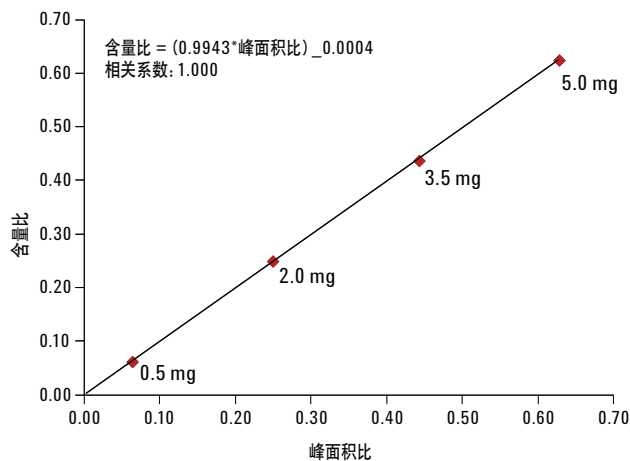


图 5. 使用四个工作台制备校准标样所获得的数据制成的甘油校准曲线。相关系数数值超过了 EN14105 方法中规定的不低于 0.9 的要求

## 工作台制备的 B100 生物柴油样品

图 6 显示了单个样品的色谱图与 10 个工作台制备样品的叠加色谱图的对比。这 10 个叠加的色谱图在保留时间和峰响应上与单个样品的色谱图几乎一致。这一结果以图形化方式显示出了工作台制备样品所具有的精度。图 7 更具体地展示了四个定量区域。此外，这些工作台制备的 10 个生物柴油样品的叠加色谱图，显示出几乎一致的结果。在甘油和单脂肪酸甘油酯区域中，只对已识别出的峰进行定量和报告。在二脂肪酸甘油酯和三脂肪酸甘油酯区域中，将各自对应区域洗脱出来的所有峰作为二脂肪酸甘油酯和三脂肪酸甘油酯进行定量和报告。

在确定最终结果前，必须计算色谱柱的性能控制以进行分析。此性能控制通过计算二脂肪酸甘油酯-C38 内标和三脂肪酸甘油酯-C57 内标的相对响应因子 (RRF) 而得。对于三脂肪酸甘油酯而言，RRF 系数必须低于 1.8 才能达到理想的检测效果。如图 6 所示，每个经工作台制备的样品均通过了此色谱柱性能控制测试。

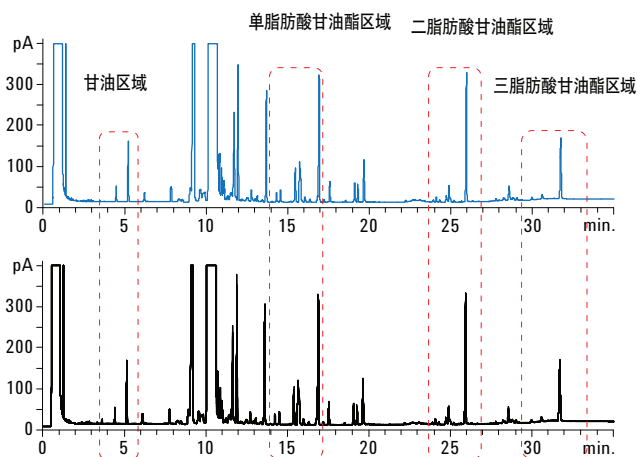


图 6. 上图是使用安捷伦工作台制备的 B100 样品单次运行得到的色谱图。甘油和甘油酯的每个定量区域都用红色标记出来。下图是使用工作台制备的 10 个样品得到的叠加色谱图

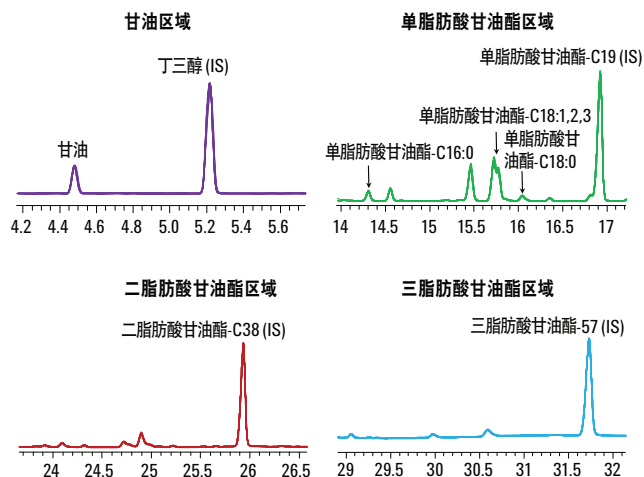


图 7. 图 5 中识别出的四个定量区域的放大图。请注意，这些图是使用工作台制备的 10 个样品的叠加色谱图

表 6. 色谱柱性能控制参数

样品	$A_{D_{IC38}}/M_{D_{IC38}}$	$A_{T_{IC57}}/M_{T_{IC57}}$	RRF
SRM01	24.4	16.5	1.5
SRM02	24.4	16.4	1.5
SRM03	24.4	16.4	1.5
SRM04	24.4	16.4	1.5
SRM05	24.5	16.5	1.5
SRM06	24.6	16.5	1.5
SRM07	24.5	16.0	1.5
SRM08	24.9	16.0	1.6
SRM09	24.9	16.0	1.6
SRM10	25.0	16.2	1.5

作为对色谱柱性能的控制，内标甘油二脂肪酸酯-C38 和甘油三脂肪酸酯-C57 的相对响应因子 (RRF) 必须小于 1.8。工作台制备的所有 10 个生物柴油样品均满足此要求。(A = 峰面积, M = 化合物质量)

在符合甘油校准和色谱柱性能控制标准的条件下，对 10 个经工作台制备的生物柴油样品中游离甘油、单脂肪酸甘油酯、二脂肪酸甘油酯、三脂肪酸甘油酯和总甘油的含量进行测定。这些结果示于表 7 中。通过每个组分计算得到的低 RSD 值可以看出，这 10 个结果之间具有出色的一致性。EN14105:2011 方法中对单个用户和多个实验室间的精度做出了完整规定。在此应用简报中，单用户精度可以通过结果得出并与方法中的要求进行对比。

单用户精度又称为重复性 ( $r$ )。重复性表示同一操作者使用同一设备对相同的测试材料进行两次测试所得结果之间的差异。EN14105 方法中对样品中每个组分的测定结果的重复性做出了要求。根据这一规定，我们取差异最大的两个结果 SRM01 和 SRM10 进行计算。将每个结果差异的绝对值与方法要求的最小差异进行比较。如表 8 所示，使用工作台制备的样品完全满足方法中对于生物柴油所有成分定量分析结果的重复性要求。

表 7. 使用安捷伦工作台制备的十个 B100 生物柴油样品的分析结果

样品	样品重量 (mg)	重量 %				
		游离甘油	单脂肪酸甘油酯	二脂肪酸甘油酯	三脂肪酸甘油酯	总甘油
SRM01	10.90	0.016	0.39	0.14	0.19	0.156
SRM02	10.40	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM03	10.63	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM04	9.59	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM05	11.12	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM06	9.93	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM07	10.46	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM08	9.66	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM09	9.74	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM10	10.01	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
	平均值	<b>0.017</b>	<b>0.39</b>	<b>0.14</b>	<b>0.19</b>	<b>0.157</b>
	标准偏差	<b>0.000</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.000</b>
	RSD	<b>1.871%</b>	<b>0.00%</b>	<b>0.00%</b>	<b>0.00%</b>	<b>0.202%</b>

表 8. 使用安捷伦工作台制备的两个 B100 生物柴油样品间的分析精度，用重复性 ( $r$ ) 表示。每个成分的重复性 ( $r$  计算值) 均高于 EN 14105:2011 方法的规定 ( $r$  规定值)

样品	重量 %				
	游离甘油	单脂肪酸甘油酯	二脂肪酸甘油酯	三脂肪酸甘油酯	总甘油
SRM01	0.016	0.39	0.14	0.19	0.156
SRM10	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
$r$ 计算值	<b>0.001</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.001</b>
$r$ 规定值	<b>0.003</b>	<b>0.04</b>	<b>0.02</b>	<b>0.02</b>	<b>0.020</b>

## 结论

Agilent 7696A 样品制备工作台可以根据经修订的欧盟方法 EN14105:2011 成功进行标样和样品的自动化前处理，以对生物柴油中的甘油污染物进行气相色谱分析。由于工作台使用 2 mL 样品瓶，EN14105 前处理的规模缩小了 10 倍。这有助于降低该分析的试剂成本，并减少废弃化学品的生成。通过工作台制备的校准标样满足方法规定的所有性能指标。使用工作台制备的 10 个生物柴油样品平行样经 GC 分析后，结果表现出相当高的精度，超过了 EN14105 方法的要求。

## 参考文献

1. DIN EN14105:2011-07 “Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of free and total glycerol and mono-, di-, and triglyceride contents”, European Committee for Standardization, Management Centre: Avenue Marnix 17: B-1000 Brussels
2. “Agilent 7696A 工作台在复杂样品自动化前处理中的应用”，James D. McCurry, 安捷伦科技有限公司，出版号 5990-7525CHCN，2011 年 3 月 1 日
3. 利用批量模式的样品前处理提高分析效率，Rebecca Veeneman, 安捷伦科技有限公司，出版号 5990-9271CHCN，2011 年 12 月 21 日
4. “使用 Agilent 7696A 样品前处理工作台自动制备标样和样品进行航空燃料中脂肪酸甲酯 (FAME) 的 GC/MS 分析”，James D. McCurry, 安捷伦科技有限公司，出版号 5990-9717CHCN，2012 年 1 月 12 日

## 更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 [www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012  
2012 年 4 月 27 日，中国印刷  
5990-9893CHCN



**Agilent Technologies**