

使用火焰离子化检测器的气相色谱法测定生物柴油中甘油和甘油酯以比较程序升温的分流/不分流进样口与冷柱头进样口的性能*

应用简报

作者

Matthew Giardina 和 James D. McCurry
安捷伦科技公司
2850 Centerville Rd
Wilmington, DE 19808

摘要

欧盟标准 EN 14105:2011-07 是利用气相色谱定量分析生物柴油中的游离甘油、残留甘油单酯、甘油二酯及甘油三酯杂质的标准方法¹。该方法规定使用“柱头进样器或同类装置”作为样品引入装置。冷柱头 (COC) 进样口似乎是一个理想选择,尤其是在甘油三酯分析中,该装置具有较高的定量准确度和精度,而且质量歧视效应极低。然而,对于这类应用,COC 存在一些缺陷。由于制备好的样品中生物柴油浓度相当高,它妨碍了甘油等早洗脱化合物的溶剂聚焦,由此导致谱带展宽以及相对于外部校准标样的保留时间位移。更棘手的问题在于使用金属保留间隙柱时,方法的耐用性较差。向保留间隙柱反复进样会导致方法控制指标在数次进样之后就不再满足要求。作为一种替代方法,本研究考察了程序升温分流/不分流 (TPSS) 进样口与 COC 的性能等效性。结果表明,TPSS 在浓度测定中的性能与 COC 进样口几乎没有差别。此外,TPSS 不会出现性能控制失败的情况,而且能为早洗脱峰提供溶剂聚焦,因此耐用性远优于 COC 进样口。

* 最初发表在 Journal of Chromatographic Science (《色谱科学杂志》) 上: Giardina, M., McCurry, J.D. Comparison of Temperature Programmable Split/Splitless and Cool On-Column Inlets for the Determination of Glycerol and Glycerides in Biodiesel by Gas Chromatography with Flame Ionization Detection. *J. Chromatogr. Sci.*, (2016), 54(5): 683-688. (<http://chromsci.oxfordjournals.org/content/early/2016/02/26/chromsci.bmw015.abstract>)



Agilent Technologies

前言

生物柴油是由各种可再生植物和动物脂质制成的燃料，其主要成分是通过甘油三酯的酯交换反应制得的脂肪酸单烷基酯。该反应分为两步，首先通过酸催化预处理将游离脂肪酸转化为烷基酯，然后烷基酯与甲醇发生碱催化的酯化反应，得到脂肪酸甲酯 (FAME) 形式的单烷基酯以及主要反应副产物游离甘油²。通过纯化去除甘油和残留的甲醇至关重要，因为这些杂质会引起部件腐蚀和发动机积碳，大幅降低燃料质量。其他杂质还包括少量未反应或部分反应的酰基甘油酯，这些杂质也会降低燃料质量，因为它们会影响燃料的低温操作性³。

欧盟标准 EN 14105:2011-07 是测定游离甘油、残留甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯浓度以确保其满足 EN 14213 和 EN 14214 质量标准的分析方法³。该方法规定使用配备火焰离子化检测器的气相色谱仪。含有游离羟基的溶质（即甘油、甘油单酯和甘油二酯）需要衍生为三甲基甲硅烷基 (TMS) 类似物以增强挥发性、减弱极性并提高色谱稳定性。就是经过硅烷化处理，该分离还涉及到各种不同挥

发性的分析物。为了在大约 30 分钟内洗脱甘油三酯，该方法规定使用可程序升温至 400 °C 的高温色谱柱。出于实际应用考虑，有必要使用金属或高温聚酰亚胺涂层的熔融石英色谱柱。该方法建议使用冷柱头 (COC) 进样口或同类产品，目的是最大程度减小质量歧视并达到最佳的定量准确度（特别是对于高沸点化合物）。COC 进样口非常适合这类分析，但它存在一些固有的局限性，包括容易因非挥发性污染物积聚而引起色谱柱污染，以及可能由于保留间隙柱或色谱柱的反应活性而导致样品潜在降解等等⁴。程序升温分流/不分流 (TPSS) 进样口（如多模式进样口 (MMI)）的通用性更强，可用于多种样品引入模式。在冷不分流模式下，TPSS 进样口可获得与 COC 相当的结果，因为相比热分流/不分流进样，这种模式不易引发质量歧视和热分解^{5,6}，而且更容易维护，在达到污染阈值时更换衬管即可，无需切割色谱柱⁷。

本研究考察了将 MMI 作为 COC 的等效替代技术用于测定生物柴油中游离甘油和酰基甘油酯的可行性。使用相同的高温金属色谱柱采集了两组数

据，一组使用 COC 进样口，另一组则使用 MMI。使用 EN 14105:2011-07 指南规定的 B100 生物柴油标准参比物质进行定性和定量分析，并按所得结果比较了两种进样口的性能。

实验部分

仪器

所有实验均采用配备火焰离子化检测器的 Agilent 7890 系列气相色谱仪。安捷伦 MMI 和 COC 进样口分别安装在前进样口和后进样口位置。在比较 COC 和 MMI 数据时，为消除结果差别，我们使用相同的 Agilent Select Biodiesel UltiMetal 色谱柱（长 15 m，直径 0.32 mm，膜厚为 0.10 μm）分析各个样品组。在 COC 实验中，安装长 2 m、直径 0.53 mm 的 UltiMetal 保留间隙柱，以便在不改动自动进样器的情况下执行柱上进样。使用安捷伦微板流路技术 Ultimate 接头将保留间隙柱连接至分析柱。在 MMI 实验中，色谱柱直接连接至进样口，不安装保留间隙柱。COC 和 MMI 实验均使用 5 μL 进样针针头引入样品。（有关仪器部件的详细信息，请参阅表 1。）

表 1. 仪器部件

组件	部件
色谱柱	用于分析甘油酯的 Select Biodiesel 专用柱，15 m × 0.32 mm，0.10 μm
COC	UltiMetal 管，2 m × 0.53 mm 用于 UltiMetal 色谱柱的 COC 衬管 Ultimate 接头工具包 隔垫，BTO，5 mm
MMI	浅凹坑衬管，内径 2 mm，200 μL 隔垫，BTO，11 mm
进样针	5 μL，23-26s 锥形针
工具	UltiMetal 管切割器 UltiMetal 管末端矫直器 钻孔器

试剂

按照 EN 14105:2011-07 中规定的方法, 使用表 2 所列的试剂配制标样和平行样品。选择来自 NIST (Gaithersburg, MD) 的大豆源 B100 标准参比物质 (SRM 2772) 作为生物柴油样品。使用相同的标样和样品评估 COC 和 MMI 进样口, 以消除可能由样品前处理的变异性引入的偏差。

仪器方法

仪器条件如表 3 所示。除了进样口条件外, 使用 COC 和 MMI 进样口采集数据时所有的设置均保持相同。对于 COC 实验, 在方法设定中将色谱柱和保留间隙柱的配置设为复合柱, 使得二者都在柱温箱加热区进行加热。

结果与讨论

色谱分析结果比较

图 1 所示为使用 COC 进样口和 MMI 分析 B100 SRM 得到的色谱图比较。色谱图中示出了正庚烷溶剂峰、FAME 洗脱范围、甘油、1,2,4-丁三醇、甘油单酯-C19 内标 (IS)、甘油二酯-C38 内标和甘油三酯-C57 内标。除了在 FAME 之前洗脱的分析物之外, 两幅色谱图在保留时间和响应方面非常相似。图 2 中横轴的放大色谱图进一步说明了该结果, 图中展示了在 FAME 区域之前所洗脱的目标峰 (甘油) 以及内标峰 (1,2,4-丁三醇) 的叠加图。两幅叠加谱图对应的样品分别是由正庚烷溶解目标化合物和内标制备而成的标样, 和对比的在正庚烷中含较大比例 FAME 的 B100, 由图可见色谱峰的保留时间和峰形均有差异。为了进行比较, 图 3 示出了在纯正庚烷和 B100 中使用 MMI 得到的目标峰与分析物峰的叠加图。

表 2. 试剂

试剂	试剂盒
硅烷化试剂 N-甲基-N-(三甲基甲硅烷基)三氟乙酰胺 (MSTFA)	生物柴油 MSTFA 试剂盒
4 种浓度的甘油标准品, 含内标 1,2,4-丁三醇, 溶于吡啶中	甘油校准标样试剂盒
十九烷酸单甘油酯 (甘油单酯-C19)、1,3-十九烷酸甘油二酯 (甘油二酯-C38) 和十九烷酸甘油三酯 (甘油三酯-C57), 溶于 THF 中	甘油酯标准储备液, 溶于 THF 中
单棕榈酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯和单油酸甘油酯, 溶于吡啶中	生物柴油甘油单酯试剂盒
B100 生物柴油 (大豆源)	标准参比物质 (NIST, 2772)

表 3. 仪器方法

组件	参数设置
载气	氦气, 5.6 mL/min, 恒流
柱温箱	在 50 °C 下保持 1 min 以 15 °C/min 的速率升温至 180 °C, 保持 0 min 以 7 °C/min 的速率升温至 230 °C, 保持 0 min 以 10 °C/min 的速率升温至 370 °C, 保持 4 min
MMI	模式: 不分流 升温程序: 在 88 °C 下保持 0.1 min 以 250 °C/min 的速率升温至 370 °C 分流出口吹扫流速: 9.6 mL/min, 在 2.5 min 处 隔垫吹扫流速: 3 mL/min
COC	模式: 炉温跟踪 隔垫吹扫流速: 1 mL/min
进样量	1 µL
FID	加热器: 380 °C H ₂ 流速: 30 mL/min 空气流速: 400 mL/min 尾吹气流速: 25 mL/min

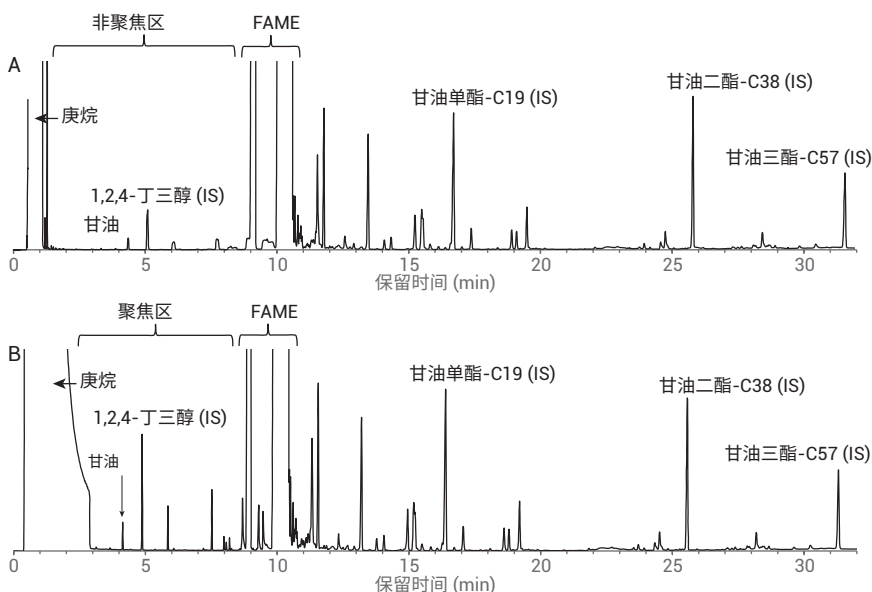


图 1. 使用 COC (A) 和 MMI (B) 得到的 B100 SRM 色谱图比较

定量比较

图 4 为使用 COC 和 MMI 获得的甘油校准曲线的叠加图。根据 EN 14105 的规定，校准曲线由甘油的相对响应和相对浓度（相对于正庚烷中 1,2,4-丁三醇）所生成。本研究使用该校准曲线定量分析生物柴油样品中游离甘油的含量。表 4 列出了回归参数。根据加标至生物柴油样品中的单一浓度标准品的相对响应对样品中残留的甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯进行定量分析。总甘油含量基于甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯浓度的加权和来确定。表 5 所示为使用 COC 和 MMI 得到的 B100 SRM 定量结果比较。

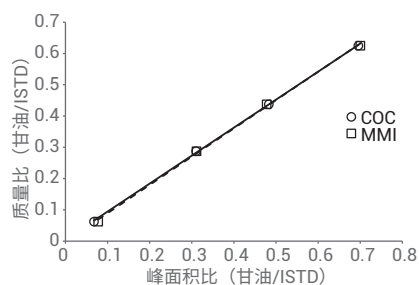


图 4. 使用 COC 进样口（实线）和 MMI（虚线）得到的经 TMS 衍生的甘油的校准曲线比较

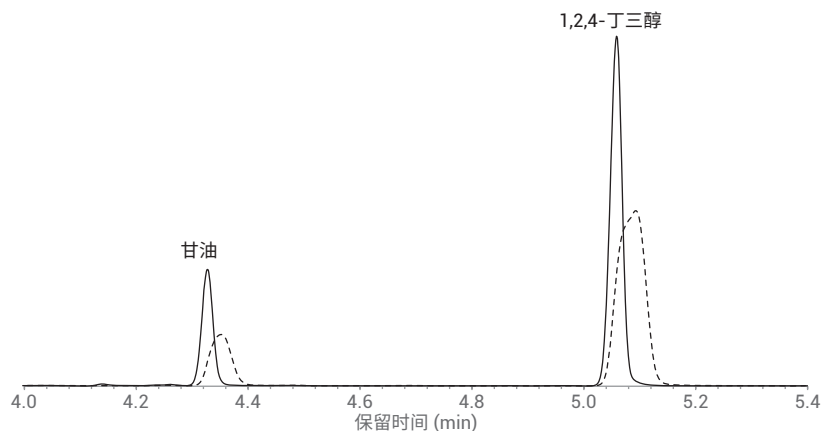


图 2. 使用 COC 进样口，比较纯庚烷（实线）和 B100 生物柴油（虚线）中甘油和 1,2,4-丁三醇的衍生物

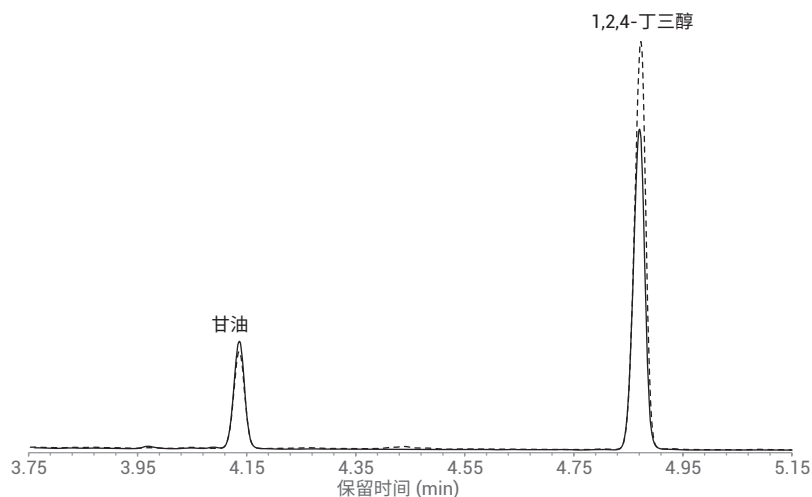


图 3. 使用 MMI，比较纯庚烷（实线）和 B100 生物柴油（虚线）中甘油和 1,2,4-丁三醇的衍生物

表 4. 甘油校准参数

进样口	斜率 ($\pm 95\%$ C.I.)	截距 ($\pm 95\%$ C.I.)	回归标准差	相关系数
COC	0.89 ± 0.04	0.01 ± 0.02	0.0045	0.99988
MMI	0.90 ± 0.09	0.00 ± 0.04	0.0097	0.99944

表 5. 使用 COC 和 MMI 测得的 B100 SRM 中甘油和甘油酯的组成对比

分析物组	COC (wt%) $\pm 95\%$ C.I.	MMI (wt%) $\pm 95\%$ C.I.	差异	EN 14105 重复性限值
甘油	0.015 ± 0.006	0.015 ± 0.006	0.000	0.003
甘油单酯	0.24 ± 0.08	0.24 ± 0.08	0.00	0.03
甘油二酯	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.00*	0.01
甘油三酯	0.05 ± 0.05	0.05 ± 0.05	0.00	0.01
总甘油	0.096 ± 0.020	0.097 ± 0.020	0.001	0.007

* 在四舍五入之前相减

耐用性比较

EN 14105 规定，每次分析都必须执行色谱柱性能控制测定，以确保准确检测甘油三酯。该方法规定，内标甘油三酯（甘油三酯-C57）相对于甘油二酯（甘油二酯-C38）的最大相对响应因子 (RRF) 不得超过 1.8。如果 RRF 大于 1.8，则表明仪器此时不适合分析。图 5 显示了使用 COC 和 MMI 进样口，多次进样由 B100 SRM 制备的样品得到的 RRF。对于 COC 进样口，RRF 随进样次数的增加而增大，直至第 8 次进样时达到阈值。通过切割 5 cm 保留间隙柱，系统性能在第 9 次进样时得以恢复。与之相比，使用 MMI 进样时所得的 RRF 更稳定，并且在执行第 16 次进样时仍未达到阈值。事实上，使用 MMI 逐次进样 50 次的 RRF 几乎没有变化（如图 6 所示），说明 MMI 在执行多次进样的过程中可保持极高的系统稳定性。

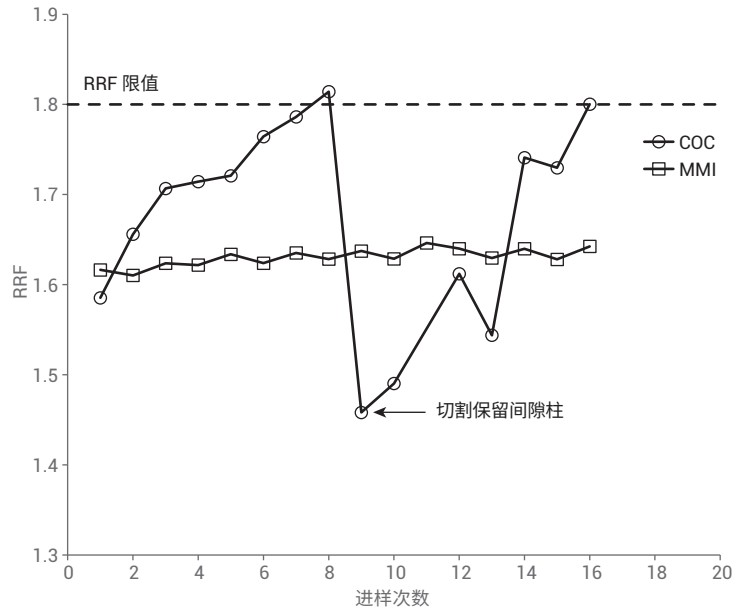


图 5. COC 和 MMI 的 RRF 相对于进样次数作图

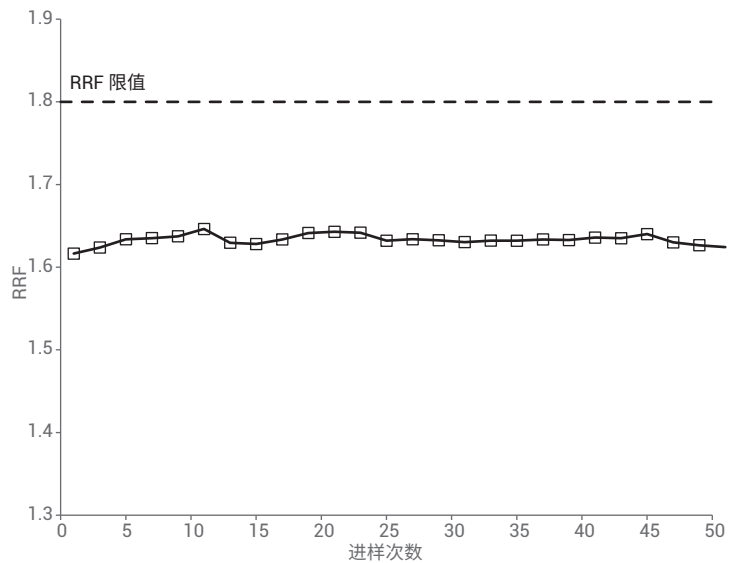


图 6. MMI 的 RRF 相对于进样次数作图

TPSS 进样口优化

根据本实验室以前积累的经验, 本研究选用了内径为 2 mm 的浅凹坑衬管。采用冷不分流进样模式分析基质中可能含有少量非挥发性污染物的样品时, 这种衬管通常是首选。错位分布的浅凹坑可避免针尖到色谱柱之间形成直接通路, 而且增大了衬管的表面积以捕集非挥发性物质。

表 3 中所列的升温程序设置基于第一性原理, 未通过实验进行优化。进样口温度设置为 88 °C, 该温度比庚烷溶剂的沸点低 10 °C, 目的是让样品以冷凝液体的形式引入。本研究选择的起始温度保持时间为 0.1 min, 旨在进样口加热之前确保样品被送入衬管并抽出进样针。进样口升温速率被设置为使得进样口在柱温箱温度达到庚烷沸点之前达到最终柱温 370 °C, 以便溶剂进行再冷凝。

进样口的最佳吹扫时间通过实验确定。本研究评估了四个吹扫时间: 1、1.2、2 和 2.5 min。最终选定的吹扫时间为 2.5 min, 因为它既能最大程度减少质量歧视 (根据甘油二酯-C38 与甘油三酯-C57 的相对响应因子确定), 又能使庚烷溶剂峰与第一个洗脱的甘油峰保持基线分离。

色谱分析结果比较

对于早洗脱化合物, 使用 MMI 和 COC 进样口分离生物柴油样品时的色谱性能差异 (如图 1-3 中的例子所示) 在很大程度上要归因于样品引

入机制不同。使用 COC 进样口和保留间隙柱进样时, 早洗脱化合物实现溶质聚焦的主要机制建立在溶剂聚焦的基础上 (即溶质从低保留性区域迁移至高保留性区域)。为实现最佳的溶剂聚焦效果, 冷凝的溶剂应在样品引入之后, 程序升温之前均匀地涂覆在保留间隙柱的壁上, 基本形成一层准固定相。在程序升温期间, 冷凝相中具有较高分配系数但挥发性较低的样品组分将重新聚焦至分析柱的柱头上。随着柱温升高, 溶剂逐渐汽化, 同时夹带低挥发性溶质进行迁移, 使得溶质浓缩, 形成窄谱带^{6,7,8}。就生物柴油而言, 高浓度 FAME 可与正庚烷形成二元溶剂混合物, 然后涂覆到保留间隙柱的壁上。早洗脱化合物中的一部分被正庚烷溶剂化, 还有一部分被 FAME 溶剂化。在这种情况下, 由于色谱柱已被加热, 早洗脱溶质的谱带会被挥发性较低的 FAME 保留, 因此, 在 FAME 峰之前洗脱的峰会发生溶质谱带扩散。生物柴油混合物与校准标样中, 甘油峰和 1,2,4-丁三醇峰 (使用 COC 进样口获得) 的比较结果支持了该假设 (图 2)。用正庚烷稀释校准标样, 前者是提供甘油和 1,2,4-丁三醇聚焦的理想溶剂, 由此生成的色谱峰与含 FAME 的 B100 生物柴油中相同化合物的峰相比更为尖锐。

由于样品引入机制不同, 使用 MMI 进样时未观察到使用 COC 时出现的溶剂聚焦干扰。使用 MMI 进样时, 样品被引入冷的进样口衬管, 然后运行进样口快速升温程序, 引入到色谱柱内的

样品是基于挥发性上的微小但明显的差异。沸点较高的 FAME 会在进样口衬管中保留较长时间, 而正庚烷、甘油、1,2,4-丁三醇及其他早洗脱化合物以空间上比较贴近的方式被转移至色谱柱。这种效应足以保持早洗脱化合物的聚焦, 如图 3 所示, 与标准样品相比, 使用 MMI 所得的生物柴油混合物中甘油和 1,2,4-丁三醇的峰形。

定量比较

EN 14105 规定使用响应曲线计算生物柴油样品中游离甘油的含量。将四种浓度下的甘油/内标浓度比相对于甘油/内标峰面积比作图, 即得到响应曲线。使用普通的线性最小二乘回归模型进行数据拟合, 以确定斜率和截距参数。根据该方法的要求, 当相关系数 (R) 大于或等于 0.9 时, 视为曲线呈线性。图 4 示出了使用 COC 进样口和 MMI 得到的校准曲线, 表 4 列出了拟合模型参数, 包括斜率、截距和相关系数。尽管该方法未做出规定, 但表 4 还列出了斜率、截距的置信区间, 以及各组数据的回归标准误差。由图 4 可以看出, 两组数据的响应曲线几乎重叠, 表 4 中列出的模型参数的置信区间也相当接近。两组数据的相关系数都超过了最低标准 0.9, 因此均可判定为线性。但是, 若以模型参数中的置信区间和回归标准误差来衡量进样口的精度, COC 进样口的精度优于 MMI。考虑到 COC 进样口的样品引入机制已被公认为最准确、最精密的进样技术, 这个结果并不意外⁴。

除甘油以外，EN 14105 还规定了甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯以及总甘油浓度的测定方法。与响应曲线计算方法不同，上述物质的浓度是根据各类甘油酯内标间的单一 RRF 进行计算。总甘油浓度值是由各组分的加权和所推导出的百分比浓度表示：游离甘油 (G)、甘油单酯 (M)、甘油二酯 (D) 和甘油三酯 (T)，如公式 1 所示。

$$GT = G + 0.255M + 0.146D + 0.103T$$

公式 1.

该方法还包括根据 EN ISO 4259:11 所述的统计方法评估 95% 置信限下的测量精度，该评估涉及两个精度指标：

- **重复性：**单名操作者、单个实验室、单台仪器测量
- **重现性：**多名操作者、多个实验室、多台仪器测量

我们开展了由 16 个实验室参与的研究来确定重复性和重现性的变异性，然后根据该研究的结果计算预期精度，从而确定了这两个指标的精度限值。将计算得到的重复性和重现性限值与两次测量结果的差值进行比较。在没有系统误差的情况下，预计结果差值应小于精度限值。本研究选择重复性指标来比较 COC 和 MMI 的结果，因为根据该指标进行的比较更为严格，而且要求达到更高的精度阈值。表 5 展示了比较结果以及 95% 置信区间下的相关不确定度。使用 EN ISO 4259 第 7.2.3 节所述的方法计算不确定度⁹。有趣的是，置信区间大于重复性精度区间。这是因为 EN ISO 4259 中规定的置信区间计算方法合并了重复性和重现性，且重现性是主项。对于每组分析物，COC 和 MMI 结果的差值均小于精度限值，表明进样口性能不存在明显差异。从分析得到的数据来看，本研究使用 MMI 得到的结果与使用 COC 得到的结果几乎没有差别。

耐用性比较

如图 5 所示，以甘油三酯内标（甘油三酯-C57）相对于甘油二酯（甘油二酯-C38）的 RRF 作为色谱柱性能控制指标，使用 COC 进样时，色谱柱性能控制指标在第 8 次进样时超出了限值 1.8，通过切割保留间隙柱，色谱柱性能在第 9 次进样时得以恢复。推测其原因，可能是进样针针头在插入金属保留间隙柱的过程中，造成间隙柱表面的磨损，破坏了去活化层。这一推测得到以下事实的支持：仅需切割一小部分保留间隙柱即可恢复性能，而切割的长度正好与针头插入保留间隙柱的大致深度相当（大约 5 cm）。即使仔细矫直保留间隙柱，仍无法消除这种效应。使用 MMI 进样时未发生这种现象（图 6），这证明了以下推测：色谱柱性能下降是 COC 样品引入的物理机制所引起，而不是由基质污染造成。

结论

EN 14105 规定使用 COC 进样口或同类装置作为分析生物柴油中甘油和甘油酯的样品引入装置。本应用简报通过比较 MMI 和 COC 的分析结果，有力证明了使用 MMI 也能达到等效性阈值。此外，相较于 COC，使用 MMI 可获得更出色的早洗脱化合物分离度，耐用性也更优异。

参考文献

1. Fat and Oil Derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of Free and Total Glycerol and Mono-, Di-, and Triglyceride Contents; DIN EN 14105:2011-07; European Committee for Standardization/ Technical Committee 307; Brussels, **2011**
2. Van Gerpen, J. H.; He, B. B. Biodiesel and Renewable Diesel Production Methods. In *Advances in Biorefineries: Biomass and Waste Supply Chain Exploitation*; Waldron, K., Ed.; Woodhead Publishing Series in Energy 53; Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge, (2014), pp 441-475
3. Carrero, A.; Pérez, Á. Advances in biodiesel quality control, characterization and standard development. In *Advances in Biodiesel Production: Process and Technologies*; Luque, R., Melero, A., Eds.; Woodhead Publishing Series in Energy 39; Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge, (2012), pp 91-130
4. Klee, M. Cool On-Column Inlets (冷柱头进样口)。摘自 *GC Inlets: An Introduction* (《气相色谱进样口入门》), 第 2 版, 第 8 章。安捷伦科技公司: Wilmington (2005), 第 87-98 页
5. Hinshaw, Jr, J. V.; Seferovic, W. Programmed-Temperature Split-Splitless Injection of Triglycerides: Comparison to Cold On-Column Injection; *J. High Resolut. Chrom Chrom. Comm.* **1986**, 9, 69-72
6. Knauss, K.; Fullermann, J.; Turner, M. P. On-Column Injection with Open Tubular Columns. *J. High Resolut. Chrom Chrom. Comm.* **1981**, 4, 641-643
7. Tipler, A. Sample Introduction Methods. In *Gas Chromatography*, Chapter 8. Poole, C.F., Ed.; Elsevier Inc., Kidlington, Oxford, (2012); pp 187-219
8. Grob, K.; Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography: Concepts, Processes, Practical Guidelines, Sources of Error, 4th Edition, Part D, Chapter 7, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, (2001); pp 339-379
9. Petroleum Products – Determination and Application of Precision Data in Relation to Methods of Test; BS EN ISO 4259:2006; International Standards Organization/ Technical Committee 28; Brussels, **2006**

www.agilent.com

本文中的信息、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, 2018
2018年3月5日, 中国出版
5991-7595ZHCN



Agilent Technologies