Agilent 7693A オートサンプラ (ALS) を用いたバイオディーゼル油の標準溶液及びサンプル前処理の自動化

アプリケーションノート

HPI/石油化学/高分子化学

著者

James D. McCurry
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809
USA

概要

Agilent 7693A オートサンプラ (ALS) の拡張機能を使用した、バイオディーゼル油の標準溶液およびサンプル前処理の自動化方法について紹介します。グリセロール/モノグリセリド/ジグリセリドのシリル化を目的とした 7693A オートサンプラを用いた誘導体化を、ASTM D6584 および EN14105 メソッド [1、2] に規定される手順に基づいて開発しました。これとは別に、脂肪酸メチルエステル (FAME) 分析の前に内部標準試料をバイオディーゼルサンプルに追加する自動化を EN14103 メソッド [3] に従って開発しました。オートサンプラを用いたメソッドを使用した場合のキャリブレーションや GC サンプル分析の結果は、マニュアル (手作業による) 調製メソッドを使用した場合と同等であり、作業の軽減を図ることができました。

Agilent Technologies

はじめに

バイオディーゼル油 (B100) の品質の判定には、いくつかの産業標準 GC メソッドが使用されています。そのうちの 2 つ、ASTM D6584 メソッドと EN14105 メソッドでは、較正用の標準溶液と最終的な B100 サンプルの調製に、非常に複雑で時間のかかる手順が規定されています。この 2 つのメソッドでは高価で毒性のある試薬も使用されるため、分析コストもかかります。最新機器には GC 処理を自動化する機能が数多く搭載されるようになっていますが、サンプルや標準溶液の調製は、依然として自動化されず手間のかかる作業で、GC 分析の誤差や精度低下の大きな原因になっています。

新しい Agilent 7693A オートサンプラには、GC 機器でのサンプル前処理を自動化する新機能が装備されています。本アプリケーションノートでは、これらの新機能を利用して 3 つのバイオディーゼル GC メソッドの生産性を高める方法について説明します。ASTM D6584 メソッドと EN14105 メソッドでは、GC 分析の前に B100 中の非揮発性グリセリドを誘導体化する必要があります。さらに、較正用の標準溶液も同様に誘導体化を実施しなければなりません。Agilent 7890A GC システムを7693A オートサンプラと組み合わせて構成すれば、ASTM D6584 および EN14105 メソッドの前処理をほとんど省略することができます。3 つ目のメソッド、EN14103 は、B100 サンプル中の脂肪酸メチルエステル (FAME) とリノレン酸メチルエステルの含有量を測定するメソッドです。このメソッドでは、各 B100 サンプルに内部標準溶液を添加する必要があります。このサンプル前処理も、7693A オートサンプラを使用して自動化が可能です。

実験

Agilent 7890A GC システムの構成は表 1 の通りです。上記の構成に加えて、GC 装置にオプションの恒温型外部カラムオーブンを設置して EN14103 分析用の HP-INNOWax カラムを格納しました。これは、高温の ASTM D6584 や EN14105 メソッドの実行時に HP-INNOWax カラムの損傷を防ぐためです。各メソッドの GC 条件を表 2 と表 3 に示します。このハードウェア構成では、1 台の機器でバイオディーゼルの GC 分析メソッドを最大 5 つまで実行することができます。

- **ASTM D6584** - グリセリン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリドの遊離および合計含有量の決定
- **EN14105** - グリセロール、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリドの遊離および合計含有量の決定
- **EN14103** - エステルおよびリノレン酸メチルエステルの合計含有量の決定
- **EN14110** - メタノール含有量の決定
- **EN14106** - 遊離グリセロールの定量

表 1.　5 種混合バイオディーゼル分析用の 7890A GC システムの構成

フロント注入口	スプリット/スプリットレス注入口 + スプリット用最適化ライナー (5188-6576)
リア注入口	クールオンカラム注入口
カラム 1	HP-INNOWax、30 m × 0.32 mm (内径) × 0.25 µm の膜厚 (19091N-113V) - 外部カラムオーブン用の特別な構成
カラム 2	DB-5ht、15 m × 0.32 mm (内径) × 0.1 µm の膜厚 (123-BD11) + 2 m × 0.53 mm (内径) のリテンションギャップ (160-2865-5)
検出器	水素炎イオン化 (FID) 検出器　2 つ
ファームウェアバージョン	A.01.10 以上
データシステム	ChemStation バージョン B.04.01 以上

表 2.　B100 バイオディーゼル中のグリセリンの遊離および合計含有量の分析に関する GC 条件 (ASTM D6584 または EN14105)

クールオンカラム注入口	
初期温度	50 °C
温度プログラム	オーブントラックモード
カラム 2 (DB-5ht) の流量	3 mL/min のヘリウム (50 °C で測定時)
カラム温度	
初期温度	50 °C (1 分間)
1	15 °C/min で 180 °C まで、ホールド時間 0 min
2	7 °C/min で 230 °C まで、ホールド時間 0 min
3	30 °C/min で 380 °C まで、ホールド時間 10 min
検出器温度 (FID)	380 °C

表 3.　エステルおよびリノレン酸メチルエステルの含有量の決定に関する GC 条件 (EN14103)

スプリット/スプリットレス注入口	
注入口温度	250 °C
スプリット流量	100 mL/min
カラム 2 (HP-INNOWax) の流量	1 mL/min のヘリウム
カラム温度	210 °C (30 分)
検出器温度 (FID)	250 °C

GC 分析でのサンプル前処理の自動化とサンプル注入の自動化の組み合わせは、2 基 (デュアル) の 7693A タワーと 7693A サンプルトレイを使用して行いました。一方のタワーはサンプル前処理に使用し、もう一方のタワーは GC カラムへの前処理済みサンプルの注入に使用しました。サンプルトレイに取り付けたオプションのヒータ／ミキサー／バーコードリーダは、前処理手順に規定されるサンプルの混合および加熱に使用しました。表 4 は、本実験で使用した 7693A オートサンプラの個々のコンポーネントをまとめたものです。各タワーおよびサンプルトレイの制御には、アジレントのクロマトグラフィーデータシステムに標準搭載されている制御ソフトウェアを使用しました。

表 4.　7693A オートサンプラの構成

フロントタワー	7693A オートインジェクタ (G4513A)
リアタワー	7693A オートインジェクタ (G4513A)
サンプルトレイ	7693A + ヒータ／ミキサー／バーコードリーダ (G4520A)
サンプル前処理用シリンジ	100 µL、PTFE プランジャ (5183-2042)
注入用シリンジ	10 µL、PTFE プランジャ (5181-3354)

表 5 は、ASTM D6584 および EN14105 に必要な標準溶液と試薬類をまとめたものです。こうしたメソッドに規定される前処理手順では、各サンプルの最終容量が 15 mL になります。7693A オートサンプラで使用される最も大きなバイアルのサイズは 2 mL です。したがって、最終容量が 2 mL のバイアルに収まるように、標準試薬とサンプル前処理手順を 10 % の量にスケールダウンする必要があります。以下に示すのは、D6584 の標準溶液を調製する際に 7693A オートサンプラで使用した 10% の量にスケールダウンした分析手順です。EN14105 の標準溶液調製にも同じ分析手順を使用しました。

1. サンプルトレイからフロントタワーへ空の 2 mL バイアルを 1 本移動します。
2. 100 µL の較正用標準混合液 #1 をバイアルに加えます (100 µL シリンジ)。
3. フロントタワーを使用して 10 µL の内部標準溶液 1 (ブタントリオール) をバイアルに加えます。
4. フロントタワーを使用して 10 µL の内部標準溶液 2 (トリカプリン) をバイアルに加えます。
5. フロントタワーを使用して 10 µL の誘導体化剤 (MSTFA) をバイアルに加えます。
6. バイアルをミキサーに移動して 1 分間撹拌します。
7. バイアルをヒータに移動して室温で 30 分間反応させます。
8. バイアルをフロントタワーに移動します。
9. フロントタワーを使用して 800 µL の n-ヘプタンをバイアルに加えます。
10. バイアルをミキサーに移動して 1 分間撹拌します。
11. バイアルをリアタワーに移動します (10 µL シリンジ)。
12. リアタワーを使用して 1 µL のオンカラムを注入します。
13. 較正用標準混合液について、手順 2 ～ 5 を繰り返します。

表 5. B100 バイオディーゼル中のグリセリンの遊離/合計含有量の分析に使用した標準溶液と試薬

ASTM D6584 スタンダードキット (5190-1408)	2 種類のプレミックス内部標準溶液と 5 種類のプレミックス較正用標準溶液を含むキット
EN14105 スタンダードキット (5190-1409)	2 種類のプレミックス内部標準溶液と 4 種類のプレミックス較正用標準溶液を含むキット
MSTFA 誘導体化試薬 (5190-1407)	10 × 1 mL アンプルの N- メチル -N- (トリメチルシリル) トリフルオロ-アセトアミド入り
モノグリセリド リテンションタイム標準溶液 (5190-1410)	3 × 1 mL アンプルのプレミックスモノグリセリド入り (リテンションタイム同定用)

B100 サンプルの前処理手順は若干異なります。まず、それぞれの大豆油 B100 サンプルを 10 mg ずつ計量して別々の 2 mL オートサンプラ用バイアルに移す必要があります。各サンプルを計量してバイアルに移したのち、各サンプルを 7693A サンプルトレイに置き、以下の手順に従って自動前処理を行いました。

1. 10 mg の B100 サンプルの入ったバイアルをサンプルトレイからフロントタワーへ移動します。
2. フロントタワーを使用して 10 µL の内部標準溶液 1 (ブタントリオール) をバイアルに加えます。
3. フロントタワーを使用して 10 µL の内部標準溶液 2 (トリカプリン) をバイアルに加えます。
4. フロントタワーを使用して 10 µL の誘導体化剤 (MSTFA) をバイアルに加えます。
5. バイアルをミキサーに移動して 1 分間撹拌します。
6. バイアルをヒーターに移して室温で 30 分間反応させます。
7. バイアルをフロントタワーに移動します。
8. フロントタワーを使用して 800 µL の n-ヘプタンをバイアルに加えます。
9. バイアルをミキサーに移動して 1 分間撹拌します。
10. バイアルをリアタワーに移動します (10 µL シリンジ)。
11. リアタワーを使用して 1 µL のオンカラムを注入します。
12. 他の B100 サンプルについても同じ手順を繰り返します。

EN14103 に規定されているサンプル前処理は非常に単純です。本実験では、菜種油、ヤシ油、およびココナッツ油を原料とする 3 種類の B100 サンプルを使用しました。各 B100 サンプルを 10 mg 計量して 2 mL のオートサンプラ用バイアルに移したのち、以下の 7693A 手順に従ってサンプルの自動前処理を行いました。

1. 10 mg の B100 サンプルの入ったバイアルをサンプルトレイからリアタワーへ移動します (100 µL シリンジ)。
2. リアタワーを使用して 500 µL の内部標準溶液 (10 mg/mL の濃度で C17:0 を含んだ n- ヘプタン溶液) をバイアルに加えます (100 µL シリンジ)。
3. バイアルをミキサーに移して 1 分間撹拌します。
4. バイアルをフロントタワーに移動します (10 µL シリンジ)。
5. フロントタワーを使用してスプリット注入口に 1 µL 注入します (10 µL シリンジ)。
6. 他の B100 サンプルについても同じ手順を繰り返します。

結果

ASTM D6584 - グリセリン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリドの遊離/合計含有量の決定

標準溶液の自動前処理を行った結果、グリセロール、モノオレイン、ジオレイン、およびトリオレインについて 2 つの内部標準による 5 レベルキャリブレーションを行いました。図 1 は、各標準溶液について得られたクロマトグラムです。このクロマトグラムを見ただけでは、7693A オートサンプラで標準溶液が正しく調製できたかどうかを判断するのは困難でした。標準溶液が正常に調製されたかどうかは、図 2 に示した各検量線の直線性を見た方がよく分かります。このデータからは、どの化合物についても、ASTM D6584 の要求条件を上回る優れた直線性 (r^2 = 0.99 以上) が見られます。図 3 は、マニュアルで調製した場合と自動で調製した場合の大豆油 B100 サンプルを比較したものです。図 4 は、4 種類のグリセリドに関する溶出区間を詳しく比較したものです。このデータを見ると、10 % の量にスケールダウンした自動前処理サンプルを使用しても、完全にマニュアルで調製したサンプルと同じクロマトグラムが得られることが分かります。

EN14103 - エステルおよびリノレン酸メチルエステルの合計含有量の決定

図 5、6、および 7 は、EN14103 メソッドに従って分析した 3 種類のバイオディーゼルサンプルです。どのサンプルについても、7693A オートサンプラによるサンプル自動前処理とマニュアルによるサンプル前処理とでクロマトグラムに差異は見られませんでした。

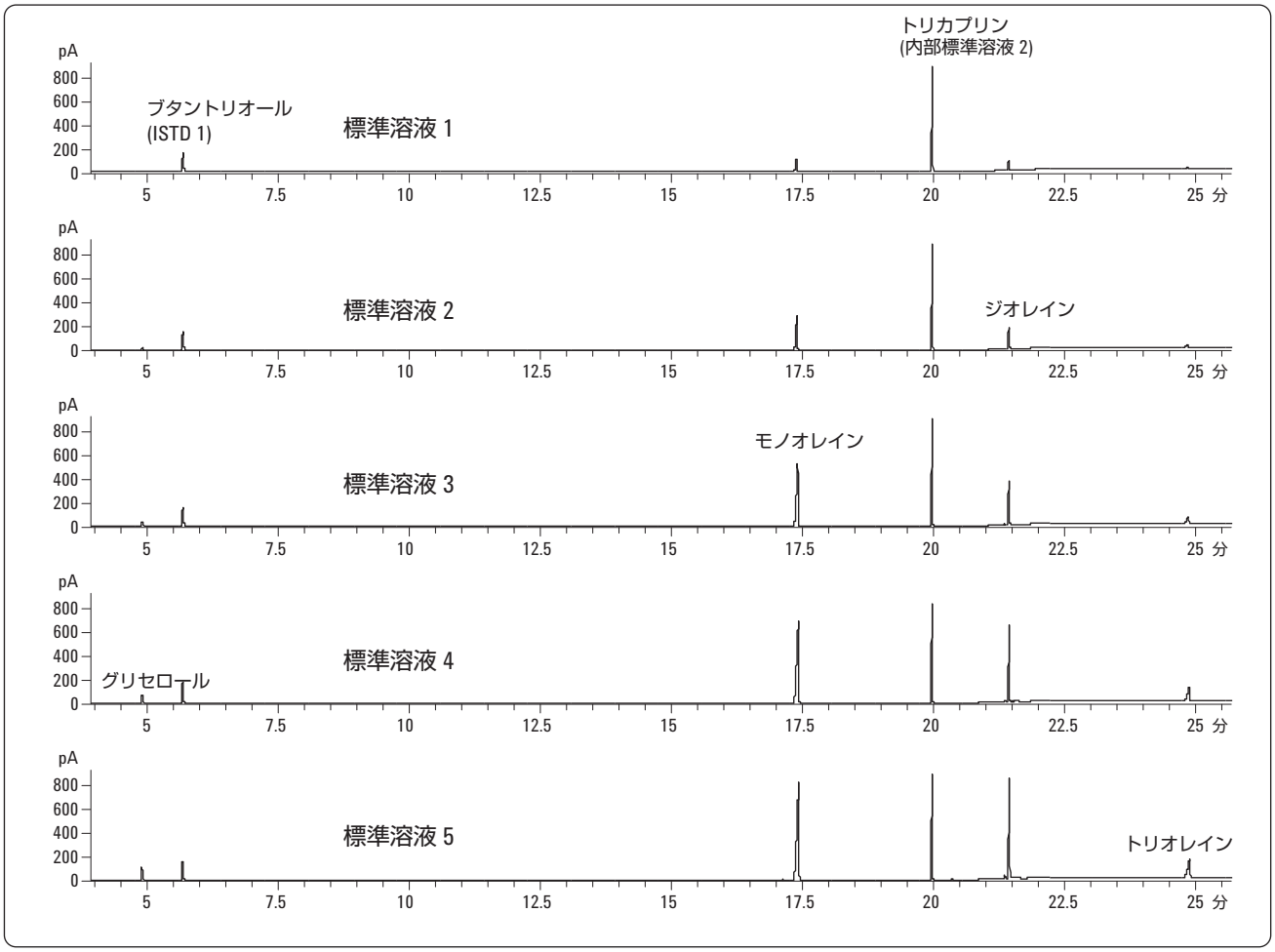


図 1. Agilent 7693A オートサンプラを使用して較正用の標準溶液を自動前処理し、Agilent 7890A バイオディーゼルアナライザで実行した 5 レベルの ASTM D6584 キャリブレーション

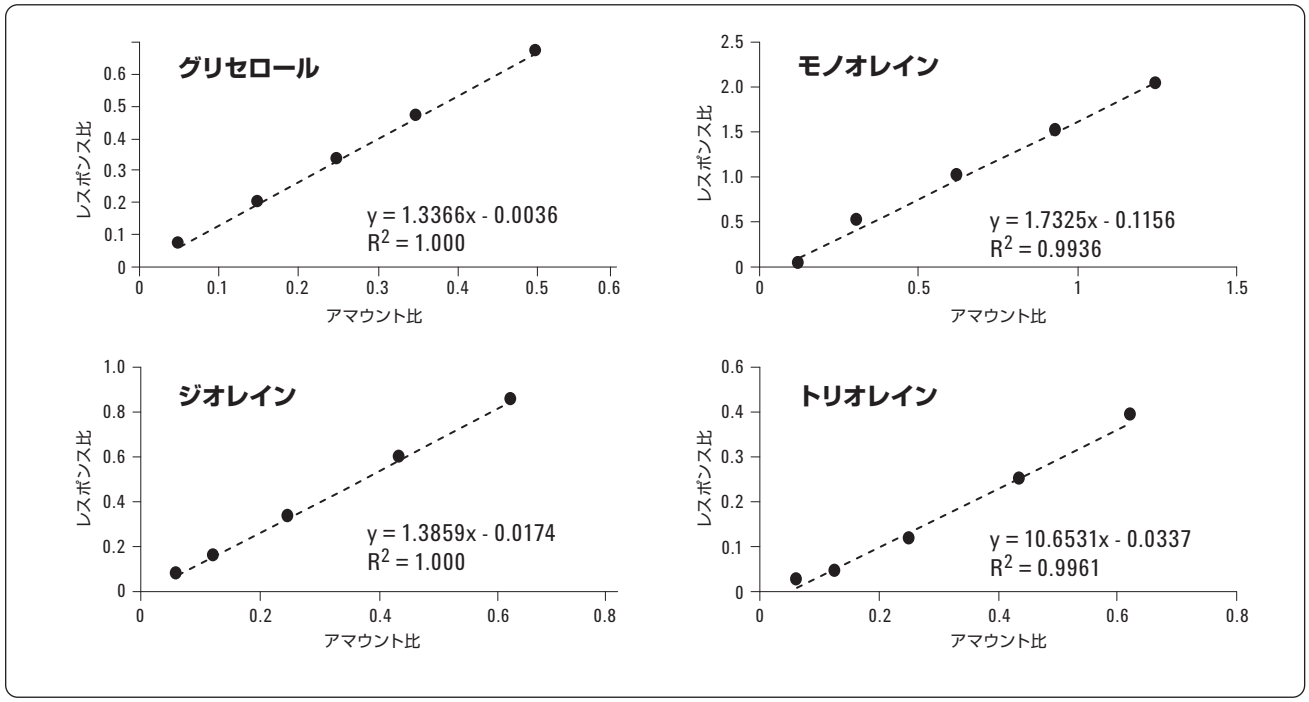


図 2.　Agilent 7693A オートサンプラで標準溶液を自動前処理したときの 5 点の検量線

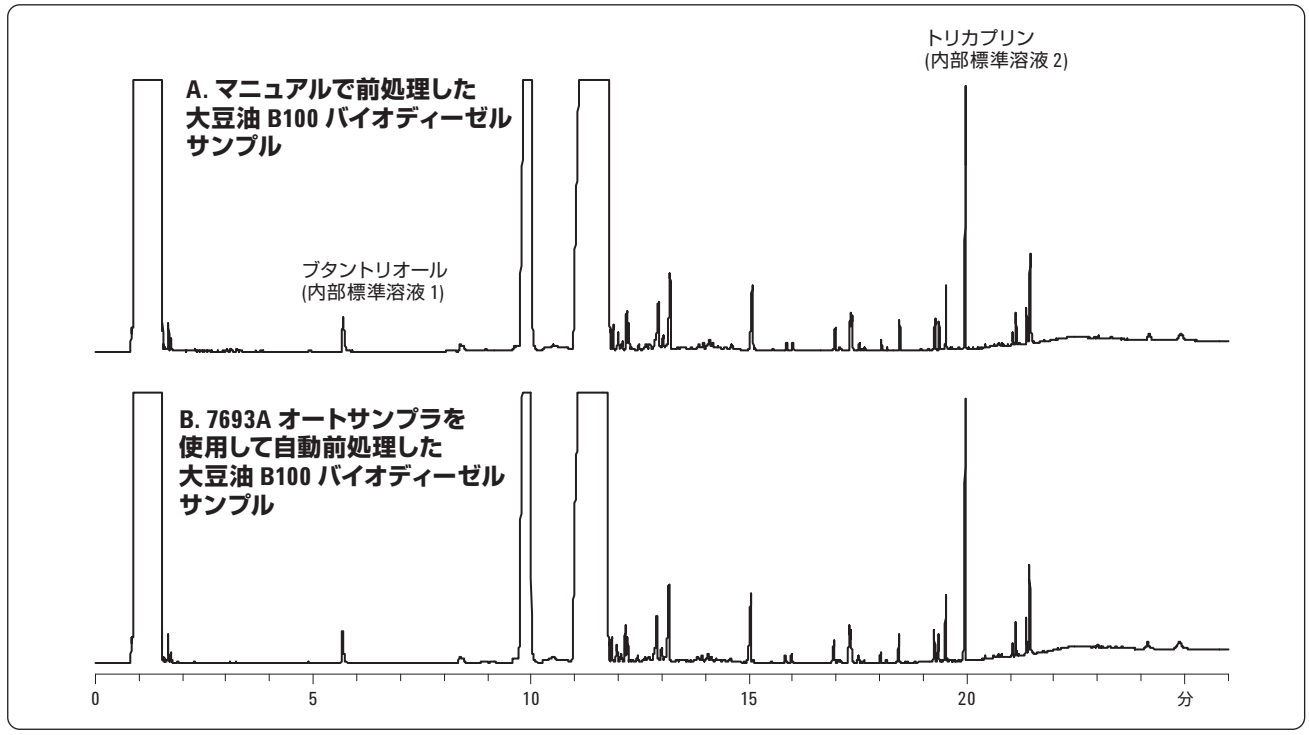


図 3.　2 つの大豆油 B100 サンプルの比較。(A) は、ASTM D6584 分析手順に従ってマニュアルで前処理したサンプル、(B) は、10 % の量にスケールダウンした分析手順に従って、Agilent 7693A オートサンプラと Agilent 7890A バイオディーゼルアナライザを使用して自動前処理したサンプル。

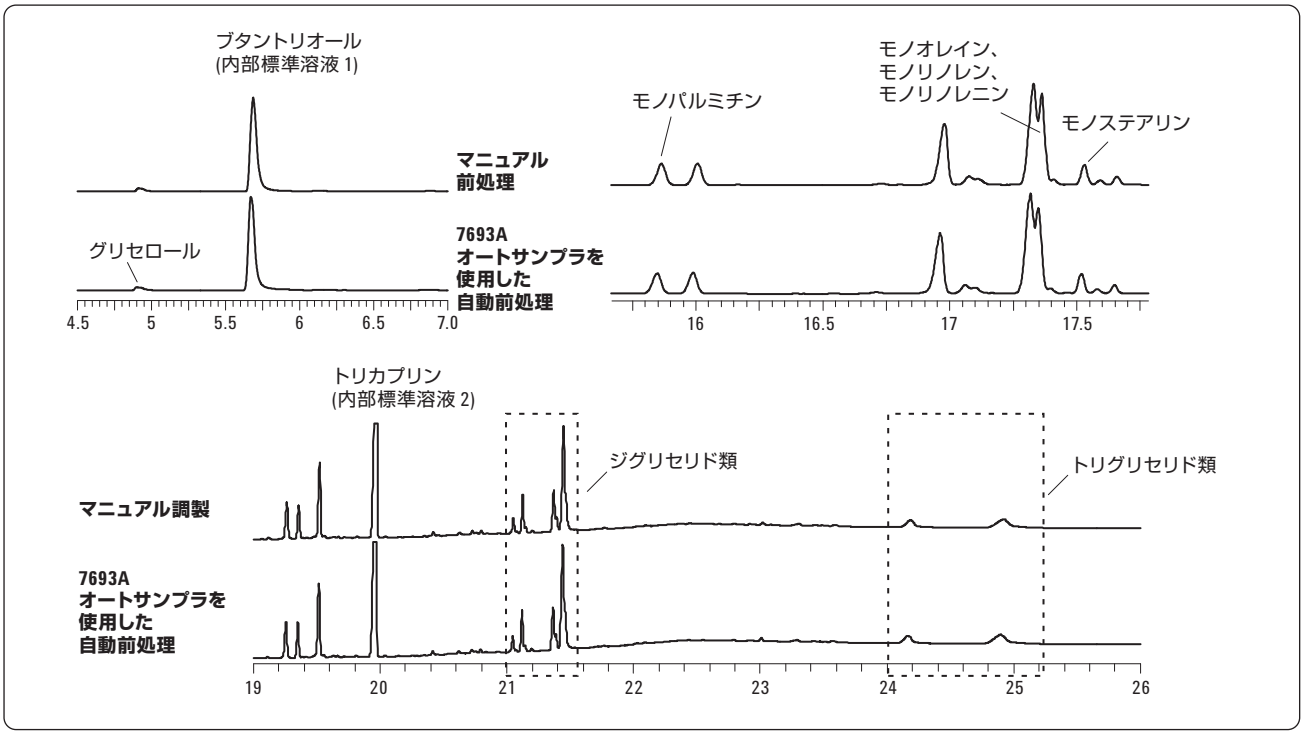


図 4. 大豆油 B100 サンプルに含有されるグリセロール、モノグリセリド、ジグリセリド、およびトリグリセリドの詳細。自動前処理したサンプルでも、マニュアルで前処理したサンプルと同じクロマトグラムが得られます。

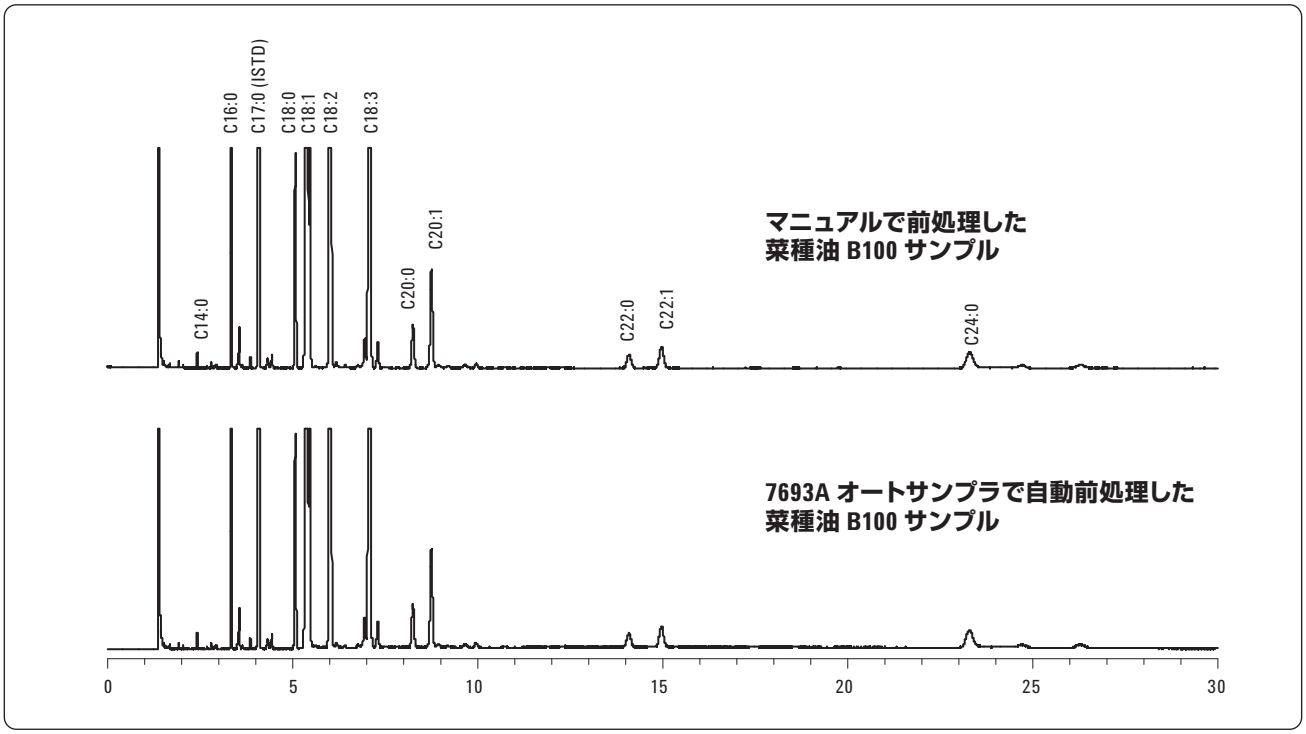


図 5. 内部標準をマニュアル添加、および自動添加した菜種油 B100 バイオディーゼルから検出された脂肪酸メチルエステル (FAME) 類。自動前処理したサンプルでも、マニュアルで前処理したサンプルと同じクロマトグラムが得られます。

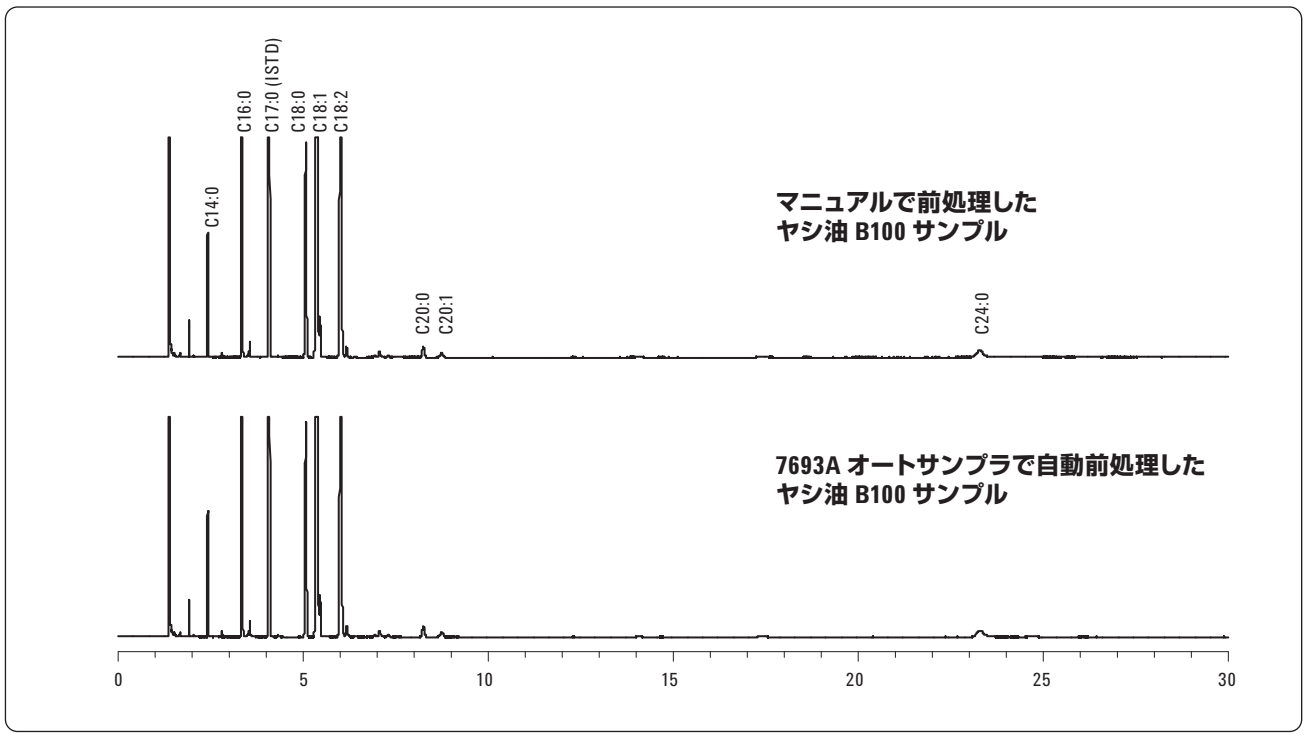


図 6. 内部標準をマニュアル添加、および自動添加したヤシ油 B100 バイオディーゼルから検出された脂肪酸メチルエステル (FAME) 類。
自動前処理したサンプルでも、マニュアルで前処理したサンプルと同じクロマトグラムが得られます。

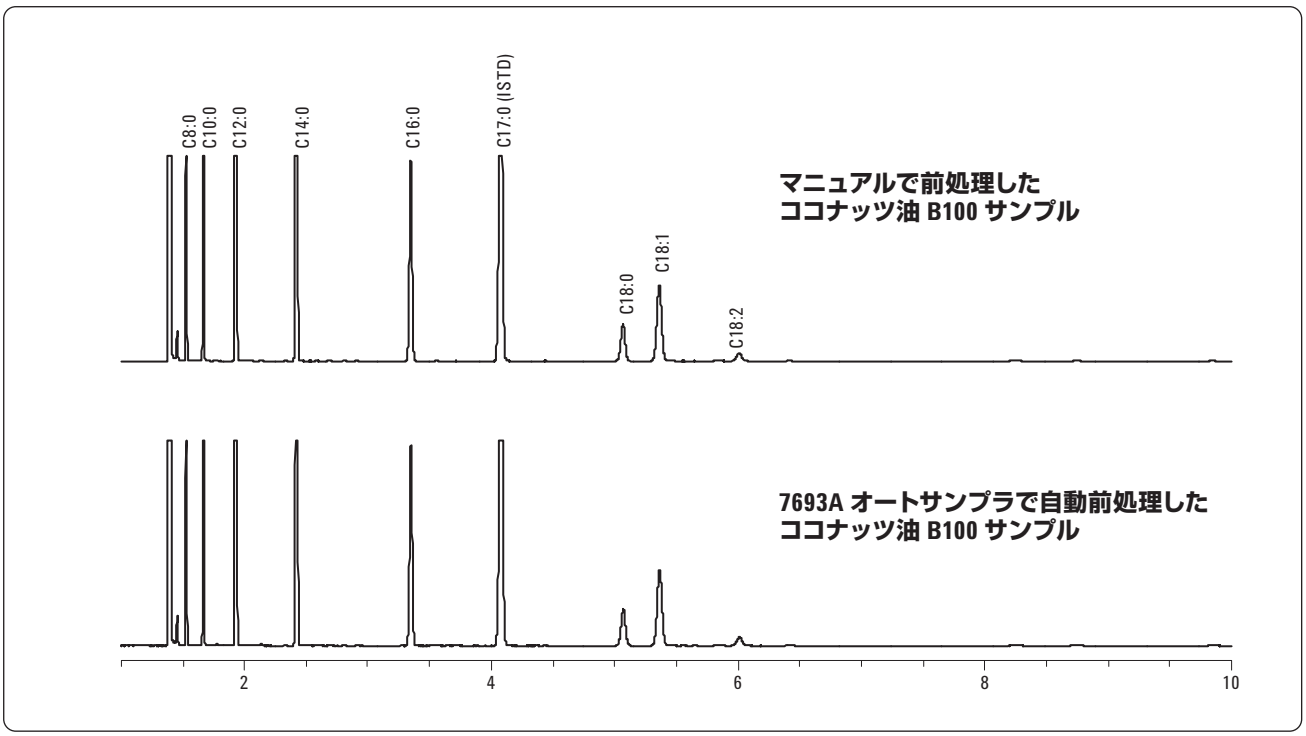


図 7. 内部標準をマニュアル添加、および自動添加したココナッツ油 B100 バイオディーゼルから検出された脂肪酸メチルエステル (FAME) 類。
自動前処理したサンプルでも、マニュアルで前処理したサンプルと同じクロマトグラムが得られます。

結論

これまで、バイオディーゼル油の品質を測定する作業は、サンプル前処理と GC 分析という 2 つの工程に分けられていました。サンプル前処理は複雑な工程であるため、誤差の発生やサンプル分析のやり直しをまねく大きな原因となっていました。本アプリケーションノートでは、B100 バイオディーゼル分析のサンプルおよび標準溶液の前処理に Agilent 7693A オートサンプラの自動前処理機能が使用できることを示しました。グリセリンの遊離/合計含有量の測定に関して ASTM D6584 および EN14105 メソッドに規定されている手作業による複雑な誘導体化手順は、7693A オートサンプラによって完全に自動化されました。このサンプル前処理手順が Agilent 7890A バイオディーゼルアナライザにおいて GC 分析条件の 1 つとして組み込まれた結果、この GC 分析については、前処理から分析までの全行程が完全に自動化できました。EN14103 メソッドを使用した脂肪酸メチルエステル (FAME) 類およびリノレン酸メチル系化合物の分析に関しても、サンプル前処理/GC 分析の自動化を開発しました。バイオディーゼル油の分析結果に最高のデータ品質が要求されるラボでは、サンプル前処理と GC 分析と両方を自動化することによって分析の信頼性と生産性を高めることができます。さらに、サンプル前処理の自動化によって、高価な試薬や標準溶液の使用量が減り、分析者が有毒物質に晒される危険性も低くなります。

参考文献

1. "D6585 Test Method for Determination of Free and Total Glycerine in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography"; ASTM International: 100 Barr Harbor Drive, West Conshohocken, PA, USA, 2007.
2. "EN14105 Fat and Oil Derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of Free and Total Glycerol and Mono-, Di- and Triglyceride Content"; European Committee for Standardization: Management Centre, rue de Stassart 36, B-1050 Brussels, 2003.
3. "EN14103 Fat and Oil Derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of Ester and Linolenic Acid Methyl Ester Content"; European Committee for Standardization: Management Centre, rue de Stassart 36, B-1050 Brussels, 2003.

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in Japan
April 13, 2009
5990-3781JAJP

Agilent Technologies