Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

采用经过优化的分析方法结合超高效合相色谱(UPC²)对市售制备级生物柴油进行分析

Mehdi Ashraf-Khorassani,[1] Giorgis Isaac,[2] 和 Larry T. Taylor [1]
[1]弗吉尼亚州布莱克斯堡，弗吉尼亚理工大学化学系
[2]沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 无需分析物柱前衍生，因此可避免人工干扰
- 12分钟内即可完全分离所有组分
- 不会发生分析物热降解

沃特世解决方案

ACQUITY UPC²系统，配以ACQUITY UPC² ELS检测器

ACQUITY UPC² HSS C_{18} SB色谱柱

关键词

SFC，合相色谱(CC)，超高效合相色谱，UPC²，三酰基甘油，TAG，甘油，生物柴油，生物燃料，脂肪酸烷基酯，FAME，FAEE，ELSD

简介

市售生物柴油通常是以甲醇或乙醇为反应物，与植物油进行酯交换制备而得。产物为脂肪酸甲酯(FAME)或脂肪酸乙酯(FAEE)。生物柴油作为一种能源，需符合特定标准。例如，三酰甘油、甘油二酯、单酰甘油和游离甘油等酰基甘油类杂质的含量应介于0.2%-0.8%，甘油含量应为0.02%。上述杂质的极性、溶解度和挥发性各不相同。

生物柴油杂质分析的标准操作规程通常涉及气相色谱(GC)，但该方法必须借助高温(370 °C)或柱前衍生将分析物转换为挥发性较强的产物才能成功完成分析。高温GC所需条件通常比较苛刻，这会导致某些分析物发生降解和/或重排。此外，衍生化通常需要多个步骤来制备样品，非常耗时。

UltraPerformance Convergence Chromatography™ (UPC²®)是一种创新型技术，它将UPLC®的性能优势充分应用到超临界流体色谱(SFC)中。UPC²作为一种与反相液相色谱(RPLC)正交的分析技术，可与超临界CO_2和亚2 µm颗粒色谱柱结合使用，用于解决常规LC或GC分析遇到的众多分离难题。

以前，人们开发出采用ACQUITY UPC²™ HSS C_{18} SB色谱柱和蒸发光散射(ELS)检测的UPC²方法分析加标模拟混合物中的生物柴油和杂质[1]。本文所介绍的分析方法可用于分析以烟草籽油为原料的一系列自制生物柴油[2]和市售B100生物柴油。另外，为得到更加纯净的生物柴油，研究中使用装填有未键合硅胶的成品玻璃色谱柱通过重力自流对自制的合成生物柴油进行了简单纯化，并使用己烷和乙醇作为混合洗脱液。

实验

样品制备

十八烷基甘油标准品购自Sigma-Alrich(密苏里州圣路易斯)。生物柴油B100购自商业来源。合成生物柴油以烟草籽油为原料(R.J.Reynolds烟草公司，北卡罗来纳州温斯顿-塞勒姆)，在乙醇体系中使用三个不同批次植物油以酯交换法自制。生物柴油的纯化方法是使用装填未键合硅胶的柱色谱进行重力自流。硅胶(60Å，200-420目)同样购自Sigma Aldrich。

方法条件

系统:	ACQUITY UPC^2
色谱柱:	ACQUITY UPC^2 HSS C_{18} SB, 1.8 µm, 3.0 x 150 mm
样品:	5%样品浓度 (溶剂：DCM/MeOH)
ABPR:	1500 psi
柱温:	25 °C
进样体积:	2-8 µL
样品溶剂:	DCM/MeOH (50/50)
流速:	1-2 mL/min
流动相A:	压缩CO_2
流动相B:	乙腈/甲醇 (90/10)
补偿溶剂:	IPA
补偿流速:	0.2 mL/min
梯度:	不同方法的梯度请见图1
检测器:	ACQUITY UPC^2 PDA 210 nm, 参比 400 - 500 nm
ACQUITY UPC^2 ELS:	喷雾器：冷却， 漂移管：50 °C， 气压：40 psi， 增益：10， 在UPC^{2}色谱柱洗脱液中加入补液流，BPR和ELSD分流比例为1:3

结果与讨论

图1所示为加入C_{18}三酰甘油、甘油二酯和单酰甘油以及游离甘油混合物的模拟生物柴油分离结果，模拟生物柴油成分为FAEE混合物。实验采用不同梯度洗脱曲线和流速以期更快完成分析，从而最大限度降低所有杂质的分离度损失。图1 — 方法A在先前的一份应用纪要中原本用于开发分离方法[1]。此方法的分析时间为17分钟，但为了缩短分析时间，本研究调整了初始流速以及改性剂的起始和结束浓度，以便在10 min内完成所有化合物的分离工作(图1 - 方法B)。最终，梯度时间得到了进一步缩短，从而使得分析用时少于5 min并且保证所有杂质具有足够的分离度。因此，方法C适用于分析杂质含量相对较少的生物柴油。但由于样品中含有来源于烟草籽油的高浓度合成生物柴油，并且各种三酰基甘油的洗脱峰因与生物柴油峰尾邻近而可能干扰定量，所以后续分析将采用第二种方法(方法B)。在不损失分离度的情况下获得更快分析速度的方法意味着产品质量监测过程中能够实现更高的样品通量。

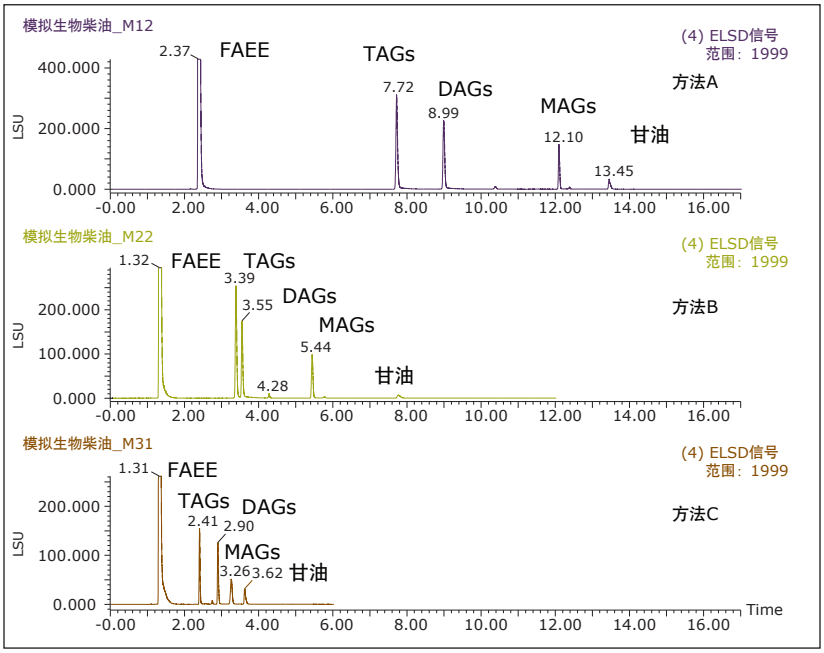

图1.UPC2单次进样模拟生物柴油、甘油以及C_{18}酰基甘油的混合物(不同梯度)。

方法A的梯度洗脱：T=0 min，98:2 CO_2/改性剂，T=10 min，80:20，T=12 min，50:50，T=15 min，50:50，T=15.5 min，98:2，T=17 min，98:2，流速：1.0 mL/min，柱温箱温度：25 °C，改性剂90:10 CH_3CN/MeOH。

方法B的梯度洗脱：T=0 min，90:10 CO_2改性剂，T=10 min，50:50，T=11 min，50:50，T=11.1 min，90:10，T=12 min，90:10，流速：1.2 mL/min，柱温箱温度：25 °C，改性剂90:10 CH_3CN/MeOH。

方法C的梯度洗脱：T=0 min，90:10 CO_2/改性剂，T=2 min，50:50，T=6 min，50:50，T=6.1 min，90:10，流速：1.2 mL/min，柱温箱温度：25 °C，改性剂90:10 CH_3CN/MeOH。

因此，采用方法B来确定以三批烟草籽油为原料自制合成的生物柴油纯度(图2)。如图所示，三种生物柴油样品中均存在多种杂质(保留时间窗口为2 - 4 min)以及保留时间为6.2 min的单酰甘油。

批次2样品中的总杂质量最多，批次3最少。为进行比较，本研究还选取了市售的B100生物柴油样品进行分析(图3A)。如图所示，根据保留时间结果，市售B100生物柴油中同样检测出了单酰甘油。在2 - 4 min保留时间窗口中发现了其他杂质，但未对其进行鉴定。图3B所示为加入不同已知杂质(用于进行比较)的模拟生物柴油(即，预混合FAEE)的分离结果。

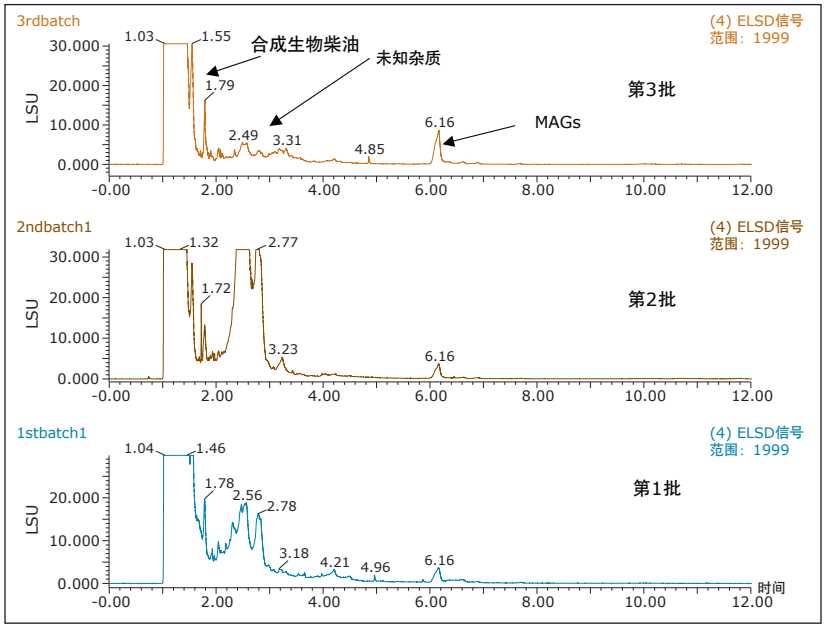

图2. 三个不同批次烟草籽油源生物柴油的UPC²色谱图。

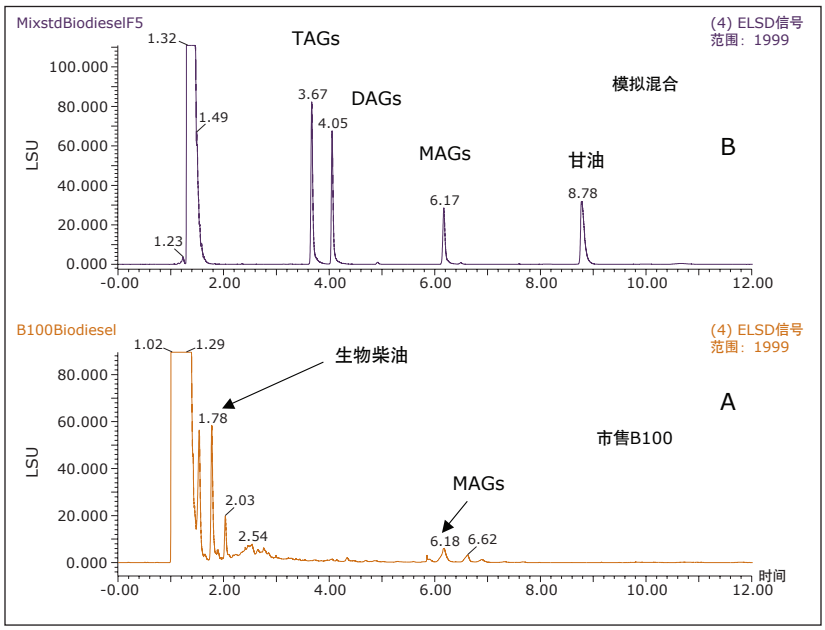

图3. 使用市售生物柴油B100和加有不同杂质的模拟生物柴油混合物执行进样。

对于生产商和行业来说，生产出不含甘油或酰基甘油的纯生物柴油非常重要，但前提是去除杂质的方法经济有效。因此，重点是要高效去除上述杂质。目前业内通常利用密度差异来分离大部分甘油杂质。本应用中，我们开发出一种仅需两步操作的简单柱色谱工艺，该工艺能够去除合成生物柴油中包括甘油在内的所有杂质。具体来说，就是让烟草籽油源生物柴油和相关杂质通过装填有未键合硅胶的色谱柱，然后先通过重力洗脱，再先后使用己烷和乙醇洗脱。

随后对所有组分进行蒸发浓缩，然后将样品溶于MeOH/DCM(1:1)。采用UPC²法进行组分分析，如图1B所示。图4所示为纯化前合成生物柴油的分离结果、己烷洗脱纯化后的分离结果以及乙醇洗脱纯化后的分离结果。如图所示，通过己烷提取物得到的合成生物柴油已近乎纯净。各生物柴油样品的乙醇洗脱物中分离并检出了在相同保留时间窗口中洗脱的单酰甘油类洗脱峰。该纯化工艺应该能够适用于需要得到纯净生物柴油(FAEE或FAME)的工业生产。使用方法C时，可利用UPC²在五分钟内轻松检出样品中的杂质。UPC²能够直接接受己烷和乙醇提取物进样，从而实现了生物柴油杂质的快速评估。

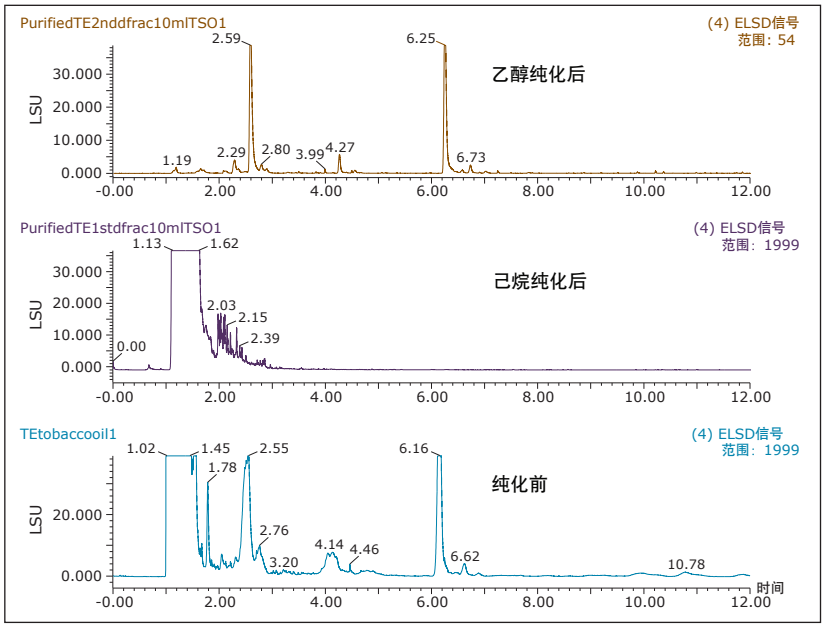

图4. 使用市售生物柴油B100和加有不同杂质的模拟生物柴油混合物执行进样。

结论

本研究成功使用一根装填有1.8 µm颗粒的ACQUITY UPC^2 HSS C_{18} SB色谱柱完成了甘油、酰基甘油和FAEE混合物(即模拟生物柴油)的分离工作。使用梯度CO_2和乙腈/甲醇作为流动相并通过ELS进行检测，优化后的方法能够快速分离并检测到生物柴油中的所有杂质，且无需进行样品衍生化或前处理。本研究中使用该方法检测了源自烟草籽油的三种不同合成生物柴油和一种市售生物柴油中的杂质，通过简单的两步柱色谱法(装填未键合硅胶)即可获得近乎纯净的生物柴油组分。UPC^{2}可在五分钟内确定该等级生物柴油的纯度。

参考文献

1. Ashraf-Khorassani M, Taylor L.T. Analysis of Impurities in Model Biodiesel using UltraPerformance Convergence Chromatography (UPC^2). Waters Application Note no. 720004872EN, 2013.
2. Mukhtar H, Ullah H, Mukhtar A. "Fatty acid composition of tobacco seed oil and synthesis of alkyd resin." Chin. *J. Chem.*, 25 (2007) 705.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, UPC^{2}和UPLC是沃特世公司的注册商标。ACQUITY UPC^{2}和Ultra Performance Convergence Chromatography是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013年 沃特世公司 中国印刷 2014年3月 720004896ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com