

# HPLC – ELSD 法测定生物柴油中的游离甘油

李 蓉, 王武生, 马晓迅, 陈 斌\*

(西北大学 化工学院 陕北能源先进化工利用技术教育部工程研究中心/陕西省洁净煤转化  
工程技术研究中心, 陕西 西安 710069)

**摘要:** 采用液液萃取及高效液相色谱 – 蒸发光散射检测技术, 建立了生物柴油中游离甘油含量的测定方法。待测生物柴油经乙腈 – 水(75 : 25) 抽提并离心分离后, 取部分下层水相进行分析。优化的色谱条件为: 色谱柱 Inertsil NH<sub>2</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 – 水(75 : 25); 流速 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 30 μL; ELSD 载气压力 360 kPa, 漂移管温度 28 °C。结果表明, 在优化条件下, 生物柴油中游离甘油的含量在 3.73 ~ 302.0 mg/kg 范围内呈良好线性, 相关系数  $r = 0.9998$ , 检出限 ( $S/N \geq 3$ ) 为 2.1 mg/kg, 其加标回收率为 98% ~ 101%, 相对标准偏差 (RSD) 为 0.59% ~ 1.8%。方法灵敏、准确且重复性好, 可为生物柴油中游离甘油含量的测定提供一种快速高效的方法。

**关键词:** 高效液相色谱法; 蒸发光散射检测器; 生物柴油; 甘油

中图分类号: O657.72; TQ645.5 文献标识码: A 文章编号: 1004 – 4957(2011)10 – 1167 – 04

doi: 10.3969/j.issn.1004 – 4957.2011.10.017

## Determination on Content of Free Glycerol in Biodiesel by HPLC – ELSD

LI Rong, WANG Wu-sheng, MA Xiao-xun, CHEN Bin\*

(Chemical Engineering Research Center of the Ministry of Education for Advanced Use Technology of Shanbei Energy, Shaanxi Research Center of Engineering Technology for Clean Coal Conversion, School of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**Abstract:** An analytical method was established for the determination of free glycerol in biodiesel by using liquid – liquid extraction technique and high performance liquid chromatography (HPLC) with evaporative light-scattering detector (ELSD). The biodiesel sample was extracted with acetonitrile – water(75 : 25), followed by centrifugation. The obtained aqueous layer was analyzed by HPLC – ELSD. The testing conditions of HPLC – ELSD were optimized and the optimal conditions were as follows: separation column: Inertsil NH<sub>2</sub> column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase: mixture of acetonitrile and water(75 : 25), flow rate: 1.0 mL/min, injection volume: 30 μL, drift tube temperature: 28 °C, gas pressure of nebulizer: 360 kPa. The result indicated that, under the optimal conditions, the calibration curve was linear over the content of free glycerol in biodiesel in the range of 3.73 – 302.0 mg/kg with a correlation coefficient of 0.9998, and the limits of detection ( $S/N \geq 3$ ) were 2.1 mg/kg. The spiked recoveries were in the range of 98% – 101% with relative standard deviations (RSDs) of 0.59% – 1.8%. The method was sensitive, accurate and reproducible, and could provide an efficient way for the determination of the content of free glycerol in biodiesel.

**Key words:** high performance liquid chromatography (HPLC); evaporative light-scattering detector (ELSD); biodiesel; glycerol

生物柴油是一种以动、植物油脂或餐饮废油等为原料, 通过酯交换工艺制成的可再生清洁燃料, 甘油为其生产过程中最主要的副产物<sup>[1]</sup>。生物柴油粗品中的游离甘油可通过水洗或膜分离等方法得以部分去除<sup>[2]</sup>, 然而在生物柴油燃烧过程中, 少量残留的游离甘油会对柴油机产生破坏作用并释放出丙烯醛等有害气体<sup>[3-6]</sup>。因此, 欧盟和美国等国家规定生物柴油中游离甘油的含量不得超过 200 mg/kg<sup>[7-8]</sup>。可见, 生物柴油中游离甘油含量的测定尤为重要。

收稿日期: 2011 – 05 – 18; 修回日期: 2011 – 07 – 07

基金项目: 陕西省科技攻关计划项目(2009K10 – 02); 陕西省自然科学基金项目(2011JM2013); 陕西省教育厅专项科研计划项目(09JK735); 西北大学科研启动基金项目(PR10028)

\* 通讯作者: 陈 斌, 博士, 高级工程师, 研究方向: 生物质能源, Tel: 029 – 88307657, E – mail: chenbin0405@163.com

生物柴油中甘油含量的测定方法很多,其中化学法最为常用,然而该方法耗时长,试剂用量大,干扰因素多<sup>[5,9-11]</sup>;电氧化法的检出限较低,但其样品前处理过程复杂,检测结果稳定性差<sup>[6]</sup>;气相色谱法比较灵敏且精确度较高,但需对甘油进行硅烷化处理,操作繁琐<sup>[12]</sup>;薄层色谱法成本低,但检出限较高,实用性不强<sup>[4]</sup>;高效液相色谱法(HPLC)在生物柴油体系中的应用比较广泛,但多用于该体系中脂肪酸及各种酯类的检测<sup>[13-16]</sup>,测定该体系中游离甘油的报道很少<sup>[17-19]</sup>。

考虑到甘油能与水或乙腈混溶且具有沸点高、对紫外无吸收的特性,本研究通过乙腈水溶液抽提待测生物柴油制备样品溶液,研究了适于分析高沸点有机物的 HPLC 法,并选用适于检测无紫外吸收不挥发物的通用型质量检测器——蒸发光散射检测器(ELSD),建立了可对生物柴油中游离甘油进行定量测定的分析方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司),ELSD-LT II 检测器(日本岛津公司),色谱柱: Inertsil NH<sub>2</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 超纯水仪(上海优普实业有限公司); GA-3000 型低噪音空气泵(北京中兴汇利科技发展有限公司); RE-5203 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); TDL-60B 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂); QL-901 型旋涡混合器(广州市永程实验仪器有限公司)。

乙腈、甲醇、异丙醇(色谱纯,霍尼韦尔 B & J 提供); 超纯水(自制); 生物柴油(参照文献[20]制备); 甘油(分析纯,天津市福晨化学试剂厂); 一级大豆油(福临门,山东菏泽市)。

### 1.2 样品溶液的制备

准确量取 8.0 mL 待测生物柴油于 20 mL 试管中,加入 2.0 mL 乙腈-水(75:25)后,塞紧管口并用旋涡混合器振荡 6 min,以 4 000 r/min 离心 20 min,移取部分下层溶液于液相色谱进样瓶中,待检。

### 1.3 色谱条件

色谱柱: Inertsil NH<sub>2</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(75:25); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 30 μL; ELSD 检测器参数: 载气压力 360 kPa, 漂移管温度 28 °C。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件及提取液的选择

2.1.1 色谱柱的选择 阳离子交换糖柱或 NH<sub>2</sub> 柱均可用于水相中游离甘油含量的测定<sup>[16-17]</sup>,而本研究是通过测定甘油抽提液中的甘油含量来确定生物柴油中的游离甘油含量。实验发现,在优化条件下,阳离子交换糖柱未能将甘油峰与杂峰完全分开。而 NH<sub>2</sub> 柱不仅可将该两峰彻底分开,且峰形好,出峰较早,信号响应高,故选用 NH<sub>2</sub> 柱。

2.1.2 流动相的选择 分别考察了以 80% 异丙醇、80% 甲醇和 80% 乙腈溶液为流动相时的分离效果,发现以 80% 乙腈溶液为流动相的效果最理想。再分别用体积比为 85:15、80:20、75:25 的乙腈-水作为流动相,对同一样品进行检测,发现随着流动相中乙腈比例的下降,甘油峰的信号大幅增强,同时停留时间大幅缩短,但流动相中水的比例过高会加速 NH<sub>2</sub> 键水解,从而严重影响柱寿命。因此,本方法选用体积比为 75:25 的乙腈-水为最佳流动相。

2.1.3 提取液的选取 分别用不同体积分数的乙腈-水溶液作为抽提液,按照“1.2”制备样品溶液并进样检测(当用 100% 乙腈作抽提液时,乙腈与待测生物柴油混溶,未能进样),结果见表 1。由表 1 可知,色谱响应信号随着抽提液中乙腈浓度的增加而增大,为确保实际样品检测过程中的灵敏度以及色谱峰形的对称性,本方法选用乙腈-水(75:25)为最佳提取液。

表 1 乙腈浓度与响应值的关系

Table 1 Relationship between response value and acetonitrile concentration

Acetonitrile : Water (by volume)	0 : 100	10 : 90	30 : 70	50 : 50	65 : 35	75 : 25
Height of peak/10 <sup>4</sup>	31.0	36.2	49.9	68.1	94.5	-*
Area of peak/10 <sup>4</sup>	225.4	257.2	356.0	490.9	649.3	-

\* value exceed the upper limit of the ELSD

2.1.4 流速的选择 分别考察了 4 种不同流速下甘油在  $\text{NH}_2$  柱上的分离情况, 结果见图 1。由图 1 可知, 随着流速的增加, 甘油与杂质的保留时间缩短, 但二者间的分离度降低, 综合考虑, 选择流动相的流速为  $1.0 \text{ mL/min}$ 。

2.1.5 柱温的选择 考察了不同柱温条件下样品在  $\text{NH}_2$  柱上的分离情况(见图 2)。结果表明, 柱温对甘油的保留时间以及与杂质间分离度的影响不大。当柱温从  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  升至  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  时, 杂质峰的出峰时间几乎一致, 甘油峰的保留时间也仅从  $3.7 \text{ min}$  缩短至  $3.5 \text{ min}$ 。故本方法选用柱温为  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.1.6 ELSD 条件的优化 漂移管温度和载气压力是决定流动相气化是否完全、基线噪音大小的重要因素, 通过对漂移管温度进行优化, 发现杂质的响应值并不受管温变化的影响, 但甘油峰的响应值却随着管温的下降而大幅增强(图 3)。然而漂移管的温度下限是环境温度, 因此本方法选定漂移管温度为  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

此外, 考虑到成本因素, 本研究使用压缩空气为载气。通常, 载气压力过大, 大液滴数量会减少, 响应值降低; 而压力过小会导致基线噪音增加, 本方法采用厂家推荐的载气压力  $360 \text{ kPa}$ , 基线噪音可维持在  $0.4 \sim 1 \text{ mV}$  之间, 满足分析要求。为扩大显示范围, 将 ELSD 增益值调为 2(Gain2)。

## 2.2 标准曲线的绘制

为消除基体效应对测定结果的影响, 本方法采用标准加入法(增量法)绘制标准曲线。参照吕扬效等<sup>[9]</sup>的方法制备去除游离甘油的生物柴油, 准确称量  $0.0300 \sim 0.0400 \text{ g}$  甘油于  $250 \text{ mL}$  锥形瓶中, 加入已去除游离甘油的生物柴油  $100.0 \text{ g}$ , 加塞后在  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中磁力高速搅拌约  $20 \text{ min}$ , 即得到高浓度的甘油溶液。再用逐级稀释并加塞搅拌的方法配成一系列已知甘油含量的生物柴油, 用所建立的 HPLC-ELSD 法进行检测, 并以峰面积  $A$  的自然对数( $\ln A$ )为横坐标, 甘油含量的自然对数( $\ln w$ )为纵坐标进行线性回归。

结果表明, 生物柴油中的甘油含量在  $3.73 \sim 302.0 \text{ mg/kg}$  范围内,  $\ln A$  与  $\ln w$  具有良好的线性关系, 其线性方程为  $\ln w = 0.7114 \ln A - 4.5168$ , 相关系数( $r$ )达  $0.9998$ 。根据信噪比  $S/N \geq 3$ , 可得方法的检出限为  $2.1 \text{ mg/kg}$ 。

## 2.3 方法的准确度与精密度

通过甘油的回收率及重复性实验, 考察了所建方法的准确度和精密度。按照“2.2”方法, 分别配制线性范围内高、中、低 3 个水平甘油含量的生物柴油样品, 并按本方法进行 6 次平行测定, 结果见表 2。由表 2 可知, 甘油的回收率为  $98\% \sim 101\%$ , 表明该方法准确度良好; RSD 均小于  $2\%$ , 故所

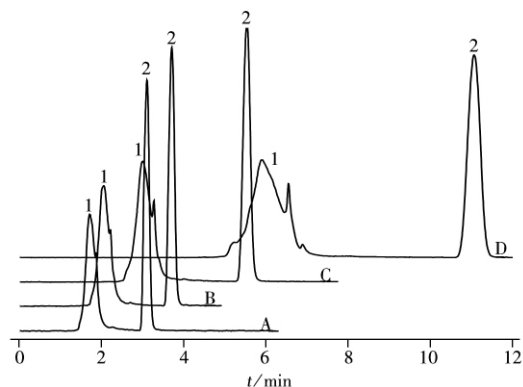


图 1 不同流速下样品溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of the sample under different flow rates

1. impurities, 2. glycerol; A:  $1.8 \text{ mL/min}$ , B:  $1.5 \text{ mL/min}$ , C:  $1.0 \text{ mL/min}$ , D:  $0.5 \text{ mL/min}$

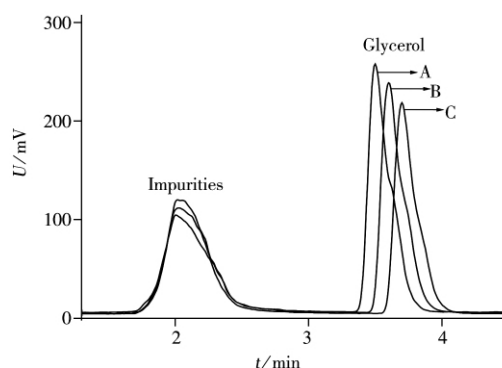


图 2 不同柱温下样品溶液的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of the sample solution under different column temperatures

A:  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ; B:  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ; C:  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; flow rate:  $1.5 \text{ mL/min}$ ; the other conditions are the same as that in Fig. 1

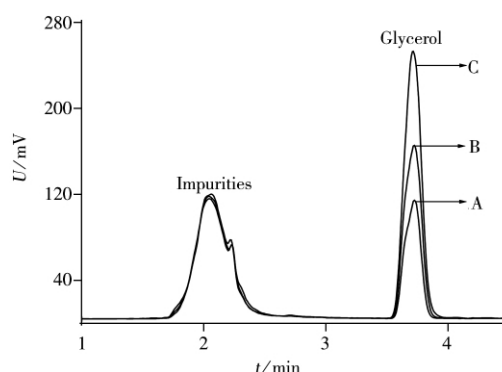


图 3 不同漂移管温度下样品溶液的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of the sample solution under different drift tube temperatures

A:  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ; B:  $31 \text{ }^\circ\text{C}$ ; C:  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ; flow rate:  $1.5 \text{ mL/min}$ ; the other conditions are the same as that in Fig. 1

建立的方法精密度较高。

## 2.4 实际样品的测定

以大豆油为原料, 参照文献 [20] 合成生物柴油, 弃去甘油层后, 旋蒸上层生物柴油(真空度 0.03 MPa, 浴温 50 °C, 时间 40 min)。将旋蒸后的生物柴油水洗 2 次(水洗条件: 水与待洗柴油的质量比 1 : 5, 浴温 40 °C, 搅拌时间 15 min), 并在每次水洗后静置 20 min, 弃去下层水相, 取少许上层生物柴油样品待测。按本方法测得水洗 1、2 次后生物柴油中的游离甘油含量分别为 92.3 mg/kg 和 4.3 mg/kg。

## 3 结论

利用游离甘油能与水或乙腈混溶的特点, 采取振荡-离心的方法对油相中的游离甘油进行有效抽提。本研究所选用的 ELSD 不仅克服了示差折光检测器(RID)对环境变化敏感、平衡时间长等缺点, 同时弥补了紫外检测器(UV)对甘油无吸收的不足。所建立的方法精密度高, 准确度良好, 检出限低, 可为生物柴油中游离甘油含量的测定提供一种快速高效的方法。

参考文献:

- [1] Ayhan D. *Biodiesel: A realistic fuel alternative for diesel engines*. London: Springer-Verlag, **2008**: 133-136.
- [2] Jehad S, André Y, Tremblay M, Dubé A. *Fuel*, **2010**, 89(9): 2260-2266.
- [3] Pilar M, Pinzi A, Haro N, Font A, Garcia-Olmo U. *Fuel*, **2011**, 90(6): 2321-2325.
- [4] Bansal K, McCrady J, Hansen A, Bhalerao K. *Fuel*, **2008**, 87(15/16): 3369-3372.
- [5] Silva S G, Fábio R, Rocha P. *Talanta*, **2010**, 83(2): 559-564.
- [6] Leandro M L, Nelson R S. *Talanta*, **2009**, 79(1): 92-96.
- [7] EN14214 and EN14106. European Committee for Standardization.
- [8] ASTM D6751. Test method for determination of free and total glycerine in B 100 biodiesel methyl esters by gas chromatography.
- [9] Lü Y X, Yang J G, Yang B. *China Oils Fats* (吕扬效, 杨继国, 杨博. 中国油脂), **2006**, 31(9): 66-67.
- [10] He P, Peng H X, Kuang S C. *Hebei Chem. Eng. Ind.* (贺平, 彭红星, 旷申昌. 河北化工), **2008**, 31(5): 60-61.
- [11] Liu W W, Su Y Y, Zhang W D, Liu S Q, Xia C F. *Renewable Energy* (刘伟伟, 苏有勇, 张无敌, 刘士清, 夏朝凤. 可再生能源), **2005**, 1(3): 14-16.
- [12] Plank C, Lorbeer E. *J. Chromatogr. A*, **1995**, 697(1/2): 461-468.
- [13] Di Nicola G, Pacetti M, Polonara F, Santori G, Stryjek R. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1190(1/2): 120-126.
- [14] Santori G, Arteconi A, Di Nicola G, Moglie M, Stryjek R. *Energy Fuels*, **2009**, 23(7): 3783-3789.
- [15] Stephen N C, James T H. *Energy Fuels*, **2010**, 24(11): 6131-6141.
- [16] Michal H, Pavel J, Jan F, Bořivoj P. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 858(1): 13-31.
- [17] Lozano P, Chirat N, Graille J, Pioch D. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1996**, 354(3): 319-322.
- [18] Martin H, František S, Jaroslav M. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, **2006**, 108(8): 666-669.
- [19] He W X, Liu C M, Zhang C C. *J. Minjiang Univ.* (何文绚, 刘昌明, 张昌财. 闽江学院学报), **2011**, 32(2): 97-100.
- [20] Pu L L, Wang S, Zhang X X, Wang B. *J. Heilongjiang Inst. Technol.* (浦丽莉, 王硕, 张雪霞, 王斌. 黑龙江工程学院学报), **2008**, 22(2): 75-77.

表2 甘油的回收率实验( $n=6$ )

Table 2 Recovery test for glycerol( $n=6$ )

Added $w_A / (\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	Average measured $\bar{w}_m / (\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	Average recovery $\bar{R} / \%$	RSD $s_r / \%$
302.0	305.62	101	1.8
69.87	68.80	98	0.59
7.58	7.60	100	0.91