

薄层色谱-热辅助水解甲基化-气相色谱法测定 生物柴油中的甘油酯

王鹏 孙杨 刘哲益 傅宇飞 潘再法 王丽丽*

(浙江工业大学化学工程与材料学院 杭州 310014)

摘 要 建立了薄层色谱-热辅助水解甲基化-气相色谱法测定生物柴油中残余甘油酯含量的方法。样品中的甘油酯经薄层色谱分离,萃取后与三甲基氢氧化硫(0.1 mol/L)各 3 μ L 先后加入到样品杯中,在 350 $^{\circ}$ C 下,于裂解器中进行衍生化反应,气相色谱测定生成的脂肪酸甲酯,确定甘油酯的含量。生物柴油中常见的甘油一酯、二酯、三酯在 60~2000 mg/L 浓度范围内线性关系良好, r^2 为 0.9863~0.9993。对于浓度为 250 mg/L 的 4 种甘油二酯重复测定 5 次,相对标准偏差为 3.2%~7.2%。本方法对实际样品中的甘油酯的测定结果表明,方法准确、灵敏。

关键词 薄层色谱;热辅助水解甲基化;气相色谱;三甲基氢氧化硫;甘油酯;生物柴油

1 引言

生物柴油是一种低硫、可再生的清洁燃料^[1],现已成为一种优质的石油柴油替代品。它是在催化剂(酸或碱)存在下,由动植物油脂与过量甲醇发生酯交换反应制得的。通常因反应不完全,生物柴油残余少量甘油一酯、二酯、三酯。残余的甘油酯过高会沉积在发动机阀门、活塞等部位,影响发动机的性能^[2]。为了控制生物柴油的品质,研究残余甘油酯的定量分析方法非常重要。现有的分析方法有气相色谱法(GC)^[3~6]、高效液相色谱-蒸发光散射检测器法(HPLC-ELSD)^[7,8]、薄层色谱-氢火焰离子化检测器法(TLC-FID)^[9]等。GC 是较常用的方法,但是甘油酯的分子量较大,需高温 GC;HPLC-ELSD 法能够用于甘油酯的分离,但是 ELSD 线性范围较窄,灵敏度不够高;TLC-FID 法能较好地分离甘油酯,但定量分析尚不够准确。

热辅助水解甲基化-气相色谱法(Thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography, THM-GC)已被应用于脂肪酸甘油酯的分析^[10],这种方法是将甘油酯在线衍生化为脂肪酸甲酯进行测定。由于生物柴油本身含有大量脂肪酸甲酯,因此仅用该法无法分析生物柴油中残余的甘油酯。本研究将 TLC 与 THM-GC 两种方法结合,即薄层色谱-热辅助水解甲基化-气相色谱法(TLC-THM-GC),生物柴油经薄层色谱分离,溶剂提取薄板上的甘油酯,采用在线热辅助水解甲基化法将甘油酯在裂解器内同时同步水解衍生为相应的脂肪酸甲酯,气相色谱测定所产生的脂肪酸甲酯,进而确定甘油酯的含量。本方法能够测定生物柴油中残余的各甘油酯的含量,同时可有效分析甘油酯中脂肪酸的组成。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CP-3800 气相色谱仪(美国 Varian 公司),配氢火焰离子化检测器;5890/5972 气质联用仪(美国 Agilent 公司);Py-2020iD 纵型微型炉裂解器(日本 Frontier Lab 公司)。

硬脂酸甘油一酯、二酯、三酯(纯品,美国 Accstandard 公司);油酸甘油二酯、亚油酸甘油二酯、亚麻酸甘油二酯(纯度 >99%,美国 Nu-Chek 公司);三甲基氢氧化硫(0.1 mol/L 甲醇溶液,日本东京化成工业株式会社);乙酸乙酯(分析纯,国药集团试剂公司);甲苯,丙酮(分析纯,衢州巨化试剂公司);GF254 硅胶板(10 cm \times 20 cm,青岛海洋化工有限公司);菜籽油、棕榈油为原料的生物柴油样品(浙江

2011-03-02 收稿;2011-05-06 接受

本文系浙江省重点科技创新团队(No. 2011R09002-11)和浙江省重中之重学科开放基金(No. 200908)资助项目

* E-mail: lili_wang@zjut.edu.cn

工业大学化学工程研究所)。

2.2 标准溶液和生物柴油样品溶液的制备

2000 mg/L 甘油二酯混合标准溶液: 称取硬脂酸 (C_{18} : 0)、油酸 (C_{18} : 1)、亚油酸 (C_{18} : 2)、亚麻酸 (C_{18} : 3)、甘油二酯各 0.0100 g, 定容至 5 mL。逐级稀释得一系列溶液, 浓度分别为 2000, 1000, 500.0, 250.0, 125.0 和 62.50 mg/L。

1900 mg/L 甘油一酯、三酯的标准溶液: 称取硬脂酸 (C_{18} : 0) 甘油一酯和三酯各 0.0038 g, 分别定容至 2 mL。逐级稀释得一系列溶液, 浓度分别为 1900, 950.0, 475.0, 237.5, 118.8 和 59.40 mg/L。

生物柴油样品溶液: 取生物柴油样品 200 μ L, 定容至 1 mL, 得稀释 5 倍后的溶液。

所有溶液皆用乙酸乙酯(分析纯)作溶剂, 进行定容与稀释, 配制的溶液存放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中。

2.3 实验方法

2.3.1 薄层色谱分离 取 100 μ L 上述标样及样品点在长为 10 cm 的硅胶板上 (20 个点, 每点 5 μ L), 以甲苯-丙酮 (92: 8, V/V) 为展开剂展开, 使用碘蒸气显色。待各斑点褪色后, 刮入试管中并加入乙酸乙酯 2~4 mL (甘油一酯与三酯组分加 2 mL, 甘油二酯组分因斑点面积较大, 硅胶较多, 加 4 mL), 超声萃取 45 min, 以 3000 r/min 离心 10 min。取 1~2 mL 上层清液 (甘油一酯与三酯取 1 mL, 甘油二酯取 2 mL) 放入到小样品瓶中, 在 110 $^{\circ}$ C 下, 于通风橱中加热蒸发至干, 加入 50 μ L 乙酸乙酯, 超声辅助溶解。

2.3.2 THM-GC 法测定 取上述样品 3 μ L 加入到样品杯中等待 5 min 使溶剂挥发后, 加入 3 μ L 0.1 mol/L 三甲基氢氧化硫 (Trimethylsulfonium hydroxide, TMSH) 将样品杯固定在进样杆上, 装入裂解器。仪器稳定后, 按下进样杆使样品杯自由落到预先设定为 350 $^{\circ}$ C 的炉心, 样品受热瞬间发生水解甲基化反应, 生成的产物立即由载气带入气相色谱进行测定。

2.4 定量方法

采用外标法进行定量分析。将各甘油酯衍生化得到的各脂肪酸甲酯的峰面积总和代入到硬脂酸甘油一酯、二酯、三酯标准曲线的线性方程, 即可求得生物柴油样品溶液中相应的甘油一酯、二酯、三酯的含量, 然后再乘以 5 (稀释倍数), 即可求得生物柴油样品中甘油酯的含量。

2.5 仪器工作参数

气相色谱: DB-23 色谱柱 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m); 柱温: 初温 80 $^{\circ}$ C, 以 20 $^{\circ}$ C/min 速率升到 180 $^{\circ}$ C, 再以 5 $^{\circ}$ C/min 速率升到 230 $^{\circ}$ C, 保持 3 min。汽化室和检测器温度均为 250 $^{\circ}$ C, 分流比 30: 1, 载气 N_2 , 柱流量 1 mL/min。

质谱: EI 离子源 (由传输线传递温度), 电离能量 70 eV, 扫描范围 40~500 amu; 配备 Nist 02 谱库。

3 结果与讨论

3.1 薄层色谱分离和定性

以 GF254 硅胶板作为薄层色谱的固定相, 选择甲苯-丙酮 (92: 8, V/V) 为展开剂, 用碘蒸气显色。如图 1 所示, 从左到右依次是硬脂酸甘油一酯, 油酸甘油二酯, 硬脂酸甘油三酯, 生物柴油样品。计算得到甘油一酯 R_f 值为 0.06; 甘油二酯 R_f 值为 0.40 和 0.55, 是同分异构体^[11]; 甘油三酯的 R_f 值为 0.92。生物柴油样品中观察到 R_f 值分别为 0.06, 0.40, 0.55, 0.92 的 4 个斑点, 与标准品比较, 可定性为甘油一酯、二酯和三酯。此外, 在甘油二酯和三酯之间还观察到一个很大的斑点, 经验证是脂肪酸甲酯。

3.2 TLC-THM-GC 方法学考察

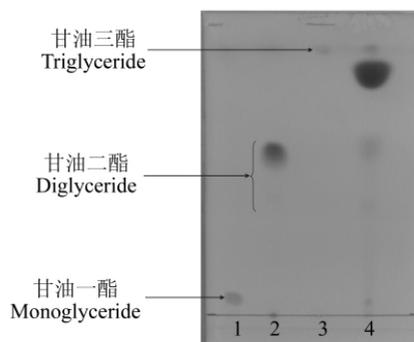


图 1 甘油酯标准品和生物柴油样品的薄层色谱图

Fig. 1 Typical chromatogram of glyceride standards and biodiesel sample obtained by TLC

1. 硬脂酸甘油一酯; 2. 油酸甘油二酯; 3. 硬脂酸甘油三酯;
4. 生物柴油样品。1. Monostearin; 2. Diolein; 3. Tristearin;
4. Biodiesel sample.

将薄板上含甘油酯的斑点刮下,经溶剂提取后用 THM-GC 测定。高温下甘油酯在过量 TMSH 存在下发生水解甲基化反应生成脂肪酸甲酯,GC 测定生成的脂肪酸甲酯,进而确定甘油酯的含量。由于以植物油为原料的生物柴油中的甘油酯主要包含硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸等脂肪酸,取含上述脂肪酸的甘油酯标样,对 TLC-THM-GC 法的线性范围、相关系数、重现性等进行了考察。欧盟规定生物柴油中甘油一酯、二酯、三酯的含量分别不高于 0.8%、0.2% 和 0.2% (w/w)^[12],根据生物柴油密度^[12] (0.86~0.90 g/mL,取 0.87 g/mL 计算)转换成质量体积浓度,经 5 倍稀释后其相应的限量分别为 1402、348 和 348 mg/L。各甘油酯在 60~2000 mg/L 的浓度范围内的线性关系良好, r^2 为 0.9863~0.9993,线性范围的下限小于欧盟规定的最大限量(表 1)。对 250 mg/L 甘油二酯平行测定 5 次,相对标准偏差小于 3.2%~7.2%,表明方法的重现性良好。上述结果表明,TLC-THM-GC 法适合测定生物柴油中的甘油酯。

表 1 甘油酯的线性范围、相关系数(r^2)、线性方程Table 1 Linear range, regression coefficient (r^2) and linear equation of glycerides

编号 Number	化合物 Compound	线性范围 Linear range (mg/L)	相关系数(r^2) Correlation coefficient	线性方程 Linear equation
1	硬脂酸甘油一酯 Monostearin	59.4~1900	0.9976	$y = 344.55x - 5679$
2	硬脂酸甘油二酯 Distearin	62.5~2000	0.9987	$y = 384.43x -$ 14664
3	硬脂酸甘油三酯 Tristearin	59.4~1900	0.9993	$y = 442.50x +$ 12849
4	油酸甘油二酯 Diolein	62.5~2000	0.9992	$y = 321.38x -$ 14827
5	亚油酸甘油二酯 Dilinolein	62.5~2000	0.9863	$y = 301.91x -$ 16826
6	亚麻酸甘油二酯 Dilinolenin	62.5~2000	0.9894	$y = 161.19x -$ 15496

3.3 生物柴油样品分析

样品按照 2.3 节实验步骤分析,各类型脂肪酸甲酯通过保留时间和质谱解析定性,按照 2.4 节定量方法计算甘油酯含量。各甘油酯中脂肪酸的组成(即相对百分含量)用归一法定量(各脂肪酸的峰面积除以该甘油酯中脂肪酸面积的总和)。

生物柴油样品经 TLC 分离后得到的各甘油酯的 THM-GC 色谱图(图 2)。生物柴油样品中各甘油酯的含量及其脂肪酸的相对百分含量见表 2。从图 2 及表 2 可见,两种生物柴油中均检测到残余的甘油一酯、二酯、三酯,而甘油酯中的脂肪酸有 C16:0 和 C18:0, C18:1, C18:2 这 4 种组分。菜籽油中主要是 C18:1 为主,在各甘油酯中其相对百分含量都大于 73%。而棕榈油中 C16:0 含量最多,在各甘油酯中其相对百分含量都超过 50%。

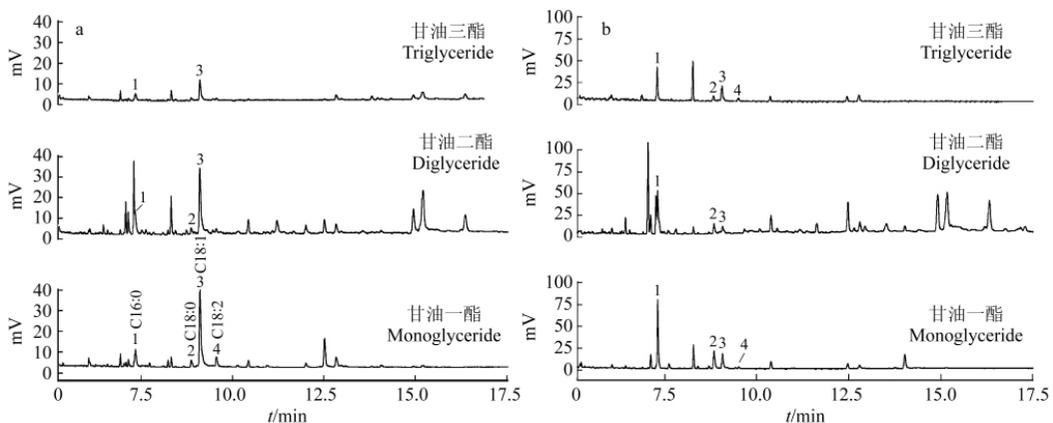


图 2 生物柴油样品经 TLC 分离后的各甘油酯的热辅助水解甲基化-气相色谱图 (a) 菜籽油为原料; (b) 棕榈油为原料

Fig. 2 Typical chromatograms obtained by thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography for residual glycerides in biodiesel samples made by rap oil (a) and palm oil (b) after TLC separation 1. 棕榈酸甲酯; 2. 硬脂酸甲酯; 3. 油酸甲酯; 4. 亚油酸甲酯。1. Methyl palmitate; 2. Methyl stearate; 3. Methyl oleate; 4. Methyl linoleate.

表 2 还表明,两种生物柴油中甘油一酯与甘油三酯的含量均低于欧盟规定的 7008 和 1740 mg/L,而甘油二酯的含量皆超过了欧盟规定的 1740 mg/L,分别为 2035 和 2601 mg/L。

表 2 菜籽油和棕榈油为原料的生物柴油样品中残余甘油酯的含量及其脂肪酸的组成

Table 2 The content of residual glycerides and their composition of fatty acids in biodiesel samples made by rap oil and palm oil

	甘油酯 Glyceride	脂肪酸的组成 Fatty acid composition				甘油酯含量 Glyceride content (mg/L)
		C16:0 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	
菜籽油 Rap oil	甘油一酯 Monoglyceride	13.1	5.7	73.4	7.8	2637
	甘油二酯 Diglyceride	18.1	4.3	77.6	-	2035
	甘油三酯 Triglyceride	22.2	-	77.8	-	445
棕榈油 Palm oil	甘油一酯 Monoglyceride	61.0	21.3	16.1	1.6	4342
	甘油二酯 Diglyceride	70.5	17.1	12.4	-	2601
	甘油三酯 Triglyceride	53.8	10.1	31.9	4.2	1455

考察了实样的加标回收率。取 200 μ L 生物柴油样品(菜籽油)分别加入油酸甘油二酯 0.54 和 1.40 mg,测得回收率分别为 96.3% 和 97.2%。相对标准偏差($n=5$)分别为 4.2% 和 3.6%。表明方法的准确度和重现性良好。实验结果表明,本方法准确、灵敏,不仅能测定生物柴油样品中各甘油酯的含量,同时可以有效检测各甘油酯中脂肪酸的组成。本方法完成一个实际样品的分析耗时约 3 h。

References

- CHENG Bei-Jiu (程备久). *Biomass Study* (生物质能学). Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2008: 176 ~ 180
- LI Chang-Xiu, YANG Hai-Ying, WANG Li-Qin, TIAN Song-Bai (李长秀, 杨海鹰, 王丽琴, 田松柏). *Chinese Journal of Chromatography* (色谱), 2006, 32(7): 524 ~ 528
- Freedman B, Kwolek W F, Pryde E H. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1986, 63(10): 1370 ~ 1375
- ZENG Jian-Li, WANG Xiao-Dong, ZHAO Bing, WANG Yu-Chun (曾建立, 王晓东, 赵兵, 王玉春). *China Oils and Fats* (中国油脂), 2007, 32(7): 66 ~ 69
- Plank C, Lorbeer E. *J. Chromatogr. A*, 1995, 697(1-2): 461 ~ 468
- LI Chang-Xiu, TANG Zhong, YANG Hai-Ying (李长秀, 唐忠, 杨海鹰). *Journal of Instrumental Analysis* (分析测试学报), 2005, 24(5): 66 ~ 68
- Foglia T A, Jones K C, Nuñez A, Phillips J G, Mittelbach M. *Chromatographia*, 2004, 60(5-6): 305 ~ 311
- Marcat B, Cecchin G. *J. Chromatogr. A*, 1996, 730(1-2): 83 ~ 90
- Freedman B, Pryde E H, Kwolek W F. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1984, 61(7): 1215 ~ 1220
- Ishida Y, Katagiri M, Ohtani H. *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216(15): 3296 ~ 3299
- Fontana J D, Zagonel G, Vechiatto W W, Costa B J, Laurindo J C, Fontana R, Pelisson L, Jorge B H, Lencas F M. *J. Chromatogr. Sci*, 2009, 47(9): 844 ~ 846
- Automotive Fuels-Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines-Requirements and Test Methods*. European Standard EN 14214-2008

Determination of Glycerides in Biodiesel by Thin Layer Chromatography-Thermally Assisted Hydrolysis and Methylation-gas Chromatography

WANG Peng, SUN Yang, LIU Ze-Yi, FU Yu-Fei, PAN Zai-Fa, WANG Li-Li*

(College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)

Abstract A method was developed for the determination of residual glycerides in biodiesel on the basis of

thin layer chromatography-thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography (TLC-THM-GC) using a pyrolysis-GC system. With the THM in the presence of an organic alkali, trimethylsulfonium hydroxide (TMSH), glycerides were converted into their corresponding fatty acid methyl esters. Thus, residual glycerides could be determined well by the total peak area of fatty acid methyl esters formed. Glycerides in samples were separated by TLC, and then were extracted. The results showed that by adding 3 μ L TMSH (0.1 mol/L) methanol solution to 3 μ L extract of sample and methylating the mixture at 350 $^{\circ}$ C, the glycerides would be sensitively determined. The calibration curves of monoglyceride, diglyceride and triglyceride exhibited good linearity with the regression coefficients from 0.9863 to 0.9993 at the concentration ranged from 60 to 2000 mg/L. The reproducibility was fairly good with the RSD ($n=5$) from 3.2% to 7.2% for four kinds of diglycerides at 250 mg/L concentration level. The potential of the proposed method was assessed by applying it to the determination of residual glyceride in biodiesel. The results prove this TLC-THM-GC technique is an accurate and sensitive method for determining residual glyceride in biodiesel samples.

Keywords Thin layer chromatography; Thermally assisted hydrolysis and methylation; Gas chromatography; Trimethylsulfonium hydroxide; Glyceride; Biodiesel

(Received 2 March 2011; accepted 6 May 2011)

《分析测试学报》2012 年征订启事

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

国内刊号: CN 44-1318/TH

国际标准刊号: ISSN 1004-4957

国际刊名代码 CODEN: FCEXES

邮发代号: 46-104

国外代号: BM 6013

广告经营许可证: 440000100186

《分析测试学报》是由中国分析测试协会、中国广州分析测试中心共同主办的全国性学术刊物,中文核心期刊。刊登质谱学、光谱学、色谱学、波谱学、电化学、电子显微学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术的研究成果,介绍新仪器装置及在生物、医药、化学化工、商检、食品检验等方面实用性强的实验技术。适合科研院所、高等院校、检测机构、医药、卫生以及厂矿企业分析测试工作和管理人员阅读。

经过多年的发展,本刊已成为国内知名的化学类核心期刊。2006年,影响因子在全国分析学科刊物排名中列第1名,被引频次每年递增约30%,稿源丰富,基金论文比超过70%。近几年,本刊刊发的论文被CA(美国化学文摘)收录率达94%,2006年引文频次在CA千种表中国部分中列第38名,并被国际上其它知名的数据库如日本科技文献速报、俄罗斯文摘、英国分析文摘(AA)、《质谱公报》等收录。在《中文核心期刊要目总览》2008年版的化学类期刊列第10位;进入由全国8000种期刊遴选出的500种科技期刊组成的“中国科技期刊精品数据库”;中国学术期刊综合评价数据库(CA-JCED)统计来源;中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊);《中国科学引文数据库》来源期刊;中国期刊全文数据库(CJFD)收录期刊;《中国核心期刊(遴选)数据库》收录;《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊;《中国期刊网》全文收录期刊;《中国学术期刊文摘(中、英文版)》收录为源期刊等。

本刊为月刊,国内外公开发行。大16开,单价:12.00元/册,全年144元。请在全国各地邮局订阅。未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。补订办法:请从邮局汇款至广州市先烈中路100号《分析测试学报》编辑部,邮编:510070,写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数(全年或某期),电话:(020)87684776或37656606,http://www.fxcsxb.com(可在线投稿),E-mail:fxcsxb@china.com。