

メソッド EN14105:2011 を使用した バイオディーゼル GC 分析に対応する Agilent 7696A サンプル前処理ワーク ベンチによるサンプル前処理の自動化

アプリケーションノート

燃料

著者

James D. McCurry, Ph.D.
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd
Wilmington, DE
19808

概要

最近改訂された EU メソッド EN14105 には、B100 バイオディーゼルに含まれるグリセロール夾雑物質の GC 分析に使用する標準およびサンプルについて、手動での前処理手順が記載されています。これには複数のステップと複雑な手順が含まれていますが、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用することにより、このメソッドにおける標準およびサンプルの前処理を自動化すると同時に、試薬の使用量と化学物質の廃棄量を 10 分の 1 まで削減することができました。ワークベンチで前処理した標準のキャリブレーション性能はメソッド要件を上回りました。市販のバイオディーゼルサンプルの検討では、メソッドの仕様を大きく上回るきわめて高い精度でサンプルの前処理ができることがわかりました。



Agilent Technologies

はじめに

EU 規制に準拠する国では、燃料に含まれる遊離および総グリセロールと、モノ、ジ、およびトリグリセリドの量を測定することで B100 バイオディーゼルの品質を確認しています。ガスクロマトグラフィー (GC) メソッド、EN14105 は、これらの化合物を分離、定量するために開発されたものです。このメソッドは、GC 分析前に不揮発性のグリセロール、モノ、およびジグリセリドなどの化合物を誘導体化し、揮発性のシラン化合物を生成するための複雑な手順の概要を示しています。2011 年に欧州標準化機構 (CEN) は、GC 性能、グリセリドの定量、および全体的な精度を向上するためにこのメソッドを改訂しました [1]。このアプリケーションノートでは、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して、キャリブレーション標準およびサンプルの前処理を自動化する方法について説明します。

ワークベンチは、自動でサンプル前処理を行うために設計されたスタンドアロン機器です。この機器は 2 つの Agilent 7693A 注入タワーを使用して、2 mL バイアル間で指定容量の液体を移動します。さまざまなケミカルリソース、標準およびサンプルが含まれるバイアルを 3 つの 50 ポジショントレイに収納します。サンプルトレイには、ロボットアーム、ボルテックス混合ポート、サンプル加熱ポートが含まれます。バイオディーゼル分析では、ワークベンチを使用して、EN14105 メソッドに類似した ASTM メソッド D6584 のサンプル前処理を適切に行いました [2]。ワークベンチで前処理したサンプルの分析結果は、手動で前処理したサンプルから得られた結果と同等でした。

Agilent ワークベンチ Easy SamplePrep (ESP) ソフトウェアがバージョンアップし、ケミカルリソースと時間をより効率的に使用できるようになりました。ESP はシンプルな操作性を提供しているため、ワークベンチの各前処理を表すドラッグアンドドロップアイコンを使用して、サンプル前処理メソッドを迅速に構築することができます。バッチモードと呼ばれる新しい操作モードにより、ワークベンチはすべてのサンプルに 1 ステップずつ共通の処理を繰り返し行ってから、次の処理に移ることができます。バッチモードを使用するメソッドでは、サンプル前処理時間の短縮に加えて、溶媒洗浄と溶媒廃棄の容量を大幅に削減できます [3、4]。

実験方法

ワークベンチによる EN14105 キャリブレーション標準の前処理

ワークベンチは、ブルーライン 25 µL ガスタイトシリンジ (p/n G4513-80241) をバックタワーに、ブルーライン 500 µL ガスタイトシリンジ (p/n G4513-60561) をフロントタワーに使用して構成しました。標準とサンプルの前処理に使用したケミカルリソースを表 1 に示します。標準グリセリド溶液を前処理するために使用した 3 つのリファレンスグリセリドは、Nu-Chek Prep (www.nu-chekprep.com) から購入しました。各ケミカルリソースを個別の 2 mL 高回収ガラスバイアル (p/n 5183-2030) に入れ、テフロンライニングセプタム (p/n 5040-4682) 付きのスクリーキャップを使用して密封しました。

表 1. メソッド EN14105:2011 に使用したケミカルリソースと標準

リソース	説明	サプライヤ
ヘプタン	キャピラリ GC グレード	Sigma Aldrich p/n H9629
グリセロール原液	ピリジン中に 0.5 mg/mL	Sigma Aldrich p/n 44892-U
ブタントリオール溶液	ピリジン中に 1 mg/mL	p/n 5982-0024
MSTFA	シリル化試薬	p/n 5190-1407
標準グリセリド溶液	THF 中に 2.5 mg/mL	Nu-Chek Prep
モノグリセリド RT 標準	ピリジン中に 10 mg/mL	p/n 5190-1410
ピリジン	無水グレード	Sigma Aldrich p/n 270970

Agilent ESP ソフトウェアを使用してケミカルリソースのトレイレイアウトを決定し、1 バイアルあたりの使用量やシリンジパラメータなどの初期値を割り当てました。レイアウトについて表 2 で説明し、図 1 に図を示します。

表 2. 図 1 に示した標準およびサンプルの前処理に使用する Agilent ワークベンチのケミカルリソース

リソース名	リソースのタイプ	使用のタイプ	容量 (μL)	バイアルの範囲
ヘプタン	ケミカルリソース	ポリウム	1,000	81~95
グリセロール原液	ケミカルリソース	ポリウム	1,000	61
ブタントリオール溶液	ケミカルリソース	ポリウム	1,000	62
MSTFA	ケミカルリソース	ポリウム	1,000	63
標準グリセリド溶液	ケミカルリソース	ポリウム	1,000	64
モノグリセリド RT 標準	ケミカルリソース	ポリウム	1,000	65
ピリジン	ケミカルリソース	ポリウム	500	71
空バイアル				51~55

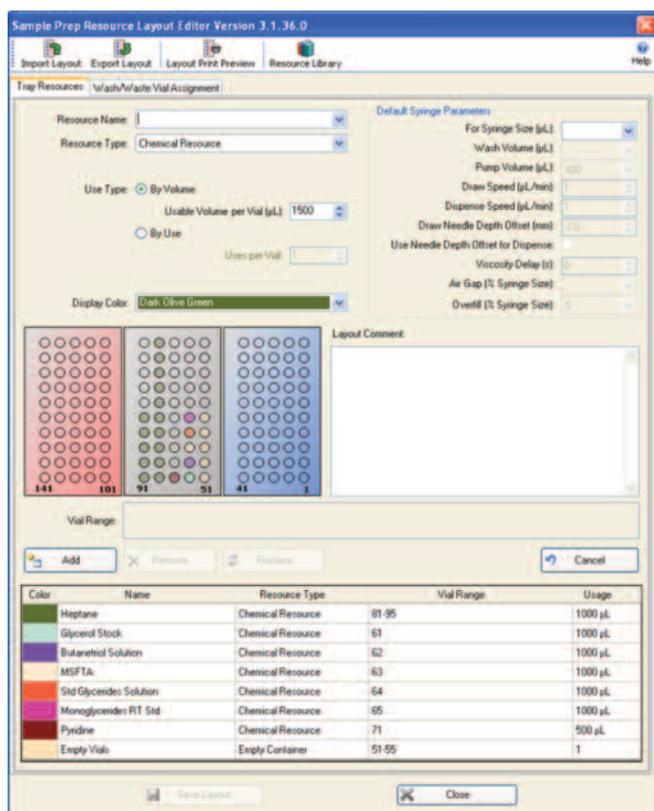


図 1. メソッド EN14105 を使用した標準およびサンプル前処理のための Easy Sample Prep (ESP) ソフトウェアのレイアウト

EN14105 メソッドでは、線形希釈を使用して5つのキャリブレーション標準を前処理する必要があります。4つの標準には、検量線作成のための異なる濃度のグリセロールと同じ濃度の内部標準である1,2,3-ブタントリオールが含まれます。もう一つのキャリブレーション標準には、バイオディーゼルに含まれるこれらの化合物を同定するために使用する3つのモノグリセリドが含まれます。EN14105 メソッドでは、約10 mLの各キャリブレーション標準を前処理するために使用する手順について概説しています。ワークベンチでは2 mLバイアルを使用するため、ボリウムを10分の1にスケールダウンする必要があります [2]。表3では、これらの5つのキャリブレーション標準の前処理に使用する37のステップを説明します。これは線形希釈であるため、標準の前処理にはESP バッチモードを使用しませんでした (図2)。高回収ガラスバイアルを使用し、ニードル深さオフセットを0にして、これらの標準の前処理に必要な少量の混合を確実に完了することが重要です。さらに、シリンジ内での気泡の発生により生じる可能性のある誤差を排除するために、各リソースを分注するときに5%の過充填を使用しました。

EN14105 用 B100 バイオディーゼルサンプルのワークベンチによる前処理

EN14105 メソッドでは、100 mg のバイオディーゼルサンプルを反応バイアルに計量し、シラン処理を行う必要があります。ワークベンチのサンプル前処理のスケールが10分の1に削減されたため、2 mL の高回収ガラスバイアルに計量したサンプルはわずか10 mg でした。化学天秤がないため、ワークベンチではサンプルの自動計量はできません。10 mg のバイオディーゼルの計量は非常に困難なため、エッペンドルフリファレンス調整式ピペッタ (10~100 µL) を使用してサンプルを計量しました。10 mg のバイオディーゼルの計量は、11.5 µL のバイオディーゼルの風袋測定後の2 mL 高回収ガラスバイアルに手でピペティングし、最も近い0.01 mg の単位まで重量を記録することで行いました。

表3. メソッド EN14105 のキャリブレーション標準を前処理するために使用するワークベンチメソッド

ステップ	ワークベンチによる処理	説明	シリンジ	吸引速度 (µL/min)	排出速度 (µL/min)	ニードル深さオフセット (mm)	粘性待ち時間(秒)	過充填 %
1	洗浄	5 µL のブタントリオールでシリンジを3回	25 µL	250	1,000		0	
2~6	追加	8 µL のブタントリオールを空バイアル1、2、3、4、5に	25 µL	250	1,000	0	2	5
7	洗浄	洗浄溶媒 A でシリンジを	25 µL	250	1,000		0	
8	洗浄	5 µL のグリセロール原液でシリンジを	25 µL	250	1,000		0	
9	追加	1 µL のグリセロール原液を空バイアル1に	25 µL	250	1,000	0	2	5
10	追加	4 µL のグリセロール原液を空バイアル2に	25 µL	250	1,000	0	2	5
11	追加	7 µL のグリセロール原液を空バイアル3に	25 µL	250	1,000	0	2	5
12	追加	10 µL のグリセロール原液を空バイアル4に	25 µL	250	1,000	0	2	5
13	追加	5 µL のモノグリセリド RT 標準を空バイアル5に	25 µL	250	1,000	0	2	5
14	追加	20 µL の標準グリセリドを空バイアル5に	25 µL	250	1,000	0	2	5
15	追加	20 µL のピリジンを空バイアル5に	25 µL	250	1,000	0	2	5
16	洗浄	洗浄溶媒 A でシリンジを3回	25 µL	250	1,000		0	
17~21	追加	15 µL の MSTFA を空バイアル1、2、3、4、5に	25 µL	250	1,000	0	2	5
22~26	混合	空バイアル1、2、3、4、5を2,500 RPM で15秒間						
27	待機	15分間						
28~32	追加	800 µL のヘプタンを空バイアル1、2、3、4、5に	500 µL	1,250	5,000	0	2	5
33~37	混合	空バイアル1、2、3、4、5を2,500 RPM で15秒間						

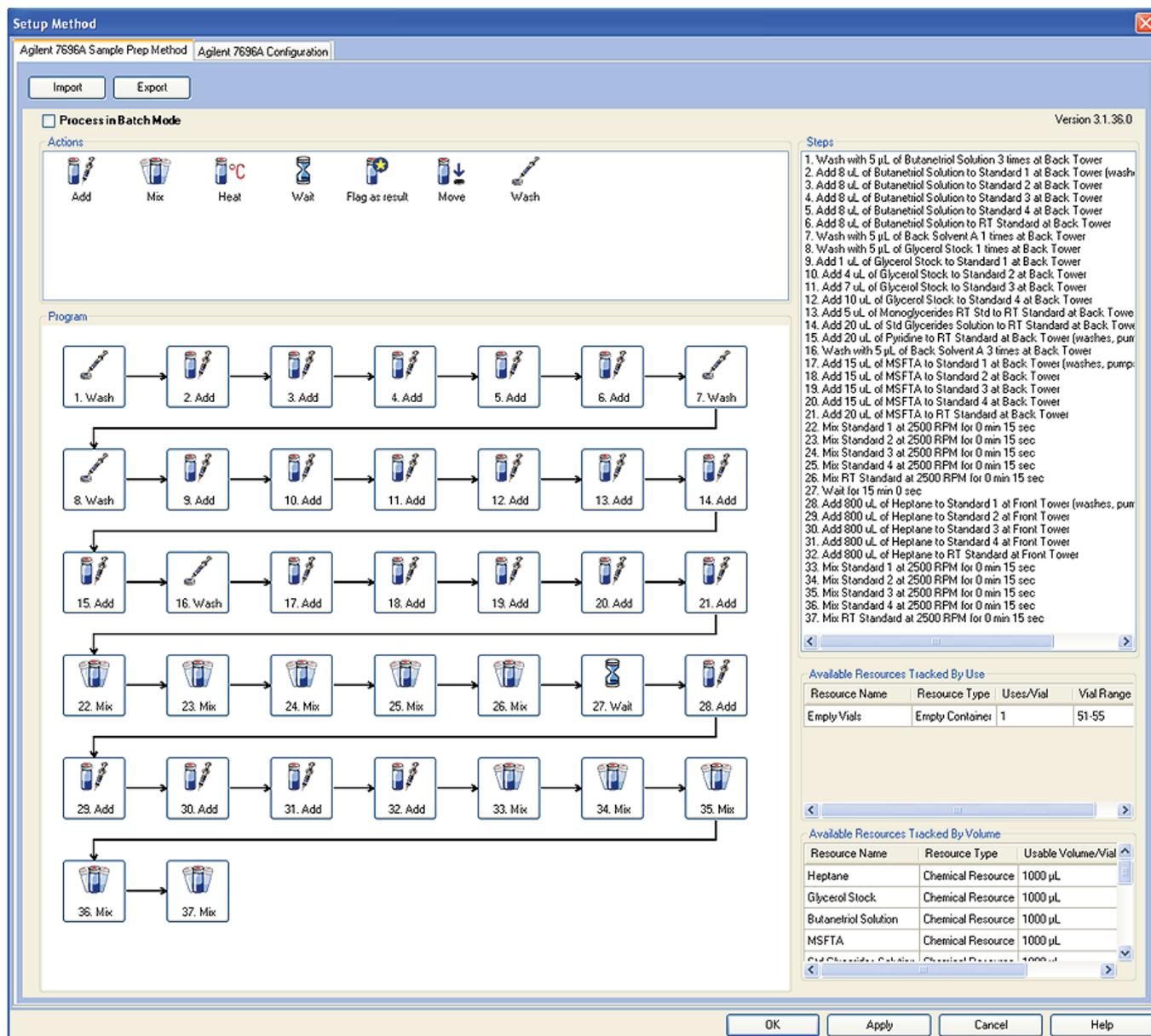


図 2. メソッド EN14105 用のキャリブレーション標準の前処理に使用する Easy Sample Prep (ESP) ソフトウェアメソッド

EN14105 メソッド用のサンプル前処理は、一定量のブタントリオール原液、標準グリセリド原液、ピリジン、および MSTFA をサンプルに追加して、不揮発性化合物を誘導体化することにより行います。追加して 15 分後にヘプタンを加えて混合し、反応を抑制します。ワークベンチには 2 mL バイアルを使用するため、添加する各試薬の量が 10 分の 1 まで削減しました。このサンプル前処理のステップを表 4 に示します。ESP ソフトウェアを使用してバッチモードメソッドを作成し、時間とリソースを削減しました。バッチモードメソッドを図 3 に示します。

標準の前処理とサンプル前処理の両方に同じリソースレイアウトを使用するため、ESP ソフトウェアのシーケンスキューを使用して両方のメソッドを同時に実行することができます。このアプリケーションノートでは、大豆油由来の B100 バイオディーゼルの前処理を 10 回繰り返して、ワークベンチによるサンプル前処理の精度を評価しました。

表 4. メソッド EN14105 用のバイオディーゼルのサンプル前処理を行うためにワークベンチが使用する個々のステップ

ステップ	ワークベンチによる処理	説明	シリンジ	吸引速度 (μL/min)	排出速度 (μL/min)	ニードル深さ オフセット (mm)	粘性待ち 時間 (秒)	過充填 %
1	洗浄	5 μL のブタントリオールでシリンジを 3 回	25 μL	250	1,000	0	0	
2	追加	20 μL のピリジンを各サンプルに	25 μL	250	1,000	0	2	5
3	追加	8 μL のブタントリオールを各サンプルに	25 μL	250	1,000	0	2	5
4	追加	20 μL の標準グリセリドを各サンプルに	25 μL	250	1,000	0	2	5
5	追加	20 μL の MSTFA を各サンプルに	25 μL	250	1,000	0	2	5
6	混合	各サンプルを 2,500 PRPM で 15 秒間						
7	待機	15 分間						
8	洗浄	200 μL の洗浄溶媒 A でシリンジを 1 回	25 μL	250	1,000		0	
9	追加	800 μL のヘプタンを各サンプルに	500 μL	1,250	5,000	0	2	5
10	混合	各サンプルを 2,500 RPM で 15 秒間						

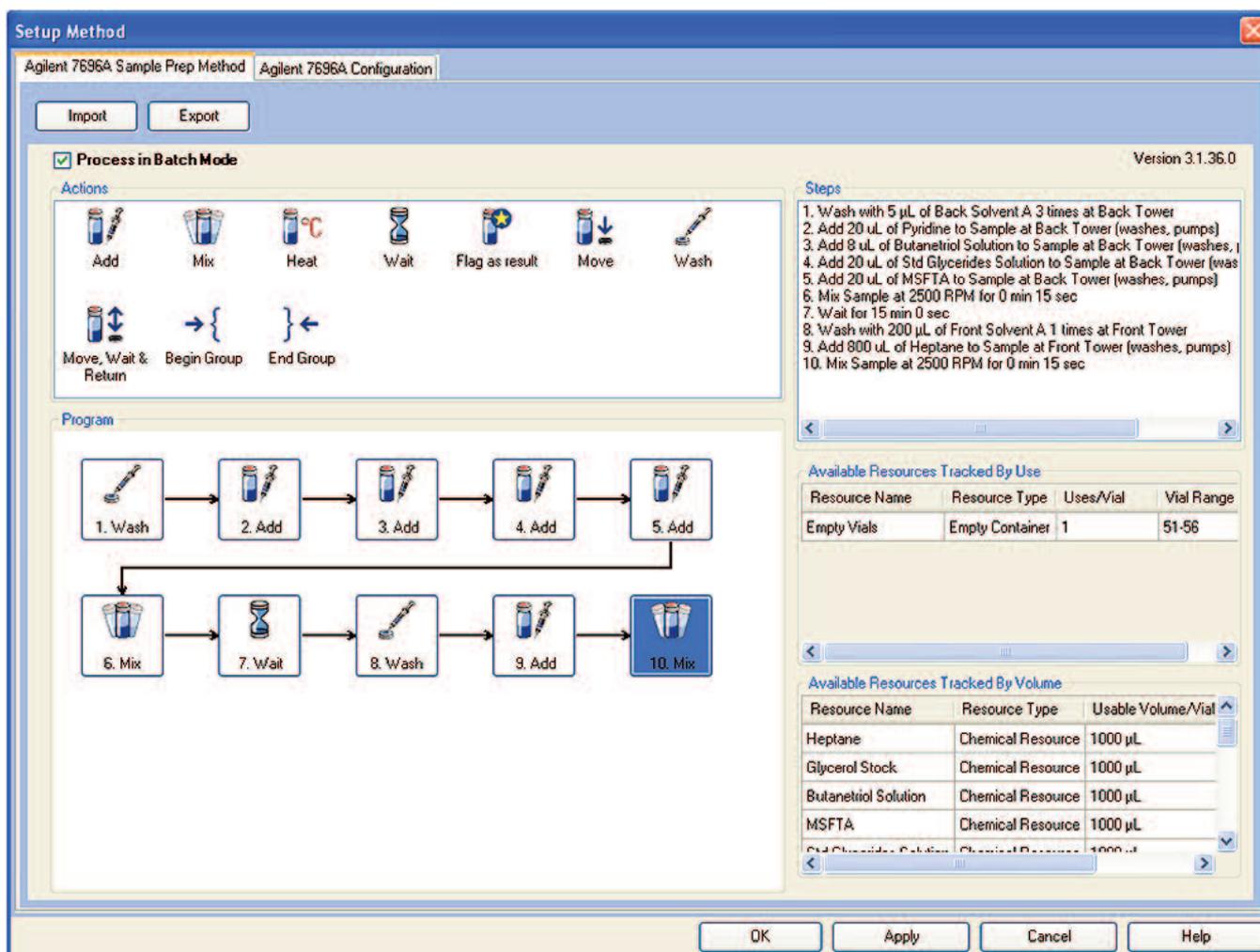


図 3. EN14105 のバイオディーゼルサンプルの前処理に使用する Easy Sample Prep (ESP) ソフトウェアのバッチモードメソッド

ワークベンチで前処理した標準およびサンプルの GC 分析

EN14105:2011 の要件に準拠するように Agilent 7890A ガスクロマトグラフ (GC) を構成しました。機器の構成と機器の測定条件を表 5 に示します。1 μL の各標準と各サンプルをこのシステムに 1 回注入しました。7890A GC の制御、データの収集、データ解析の実行に Agilent OpenLab CDS Chemstation を使用しました。

表 5. ワークベンチで前処理した標準とサンプルをメソッド EN14105:2011 を使用して分析するための Agilent 7890A GC の構成と測定条件

機器の構成

G3440A	Agilent 7890A シリーズ GC
オプション 122	EPC で制御されたクールオンカラム注入口
オプション 211	EPC で制御されたキャピラリ FID
G4513A	Agilent 7693A ALS
カラム	Select Biodiesel for Glycerides 15 m x 0.32 mm、0.1 μm (p/n cp9078)
データシステム	Agilent OpenLab CDS Chemstation C.01.03

GC の動作条件

クールオンカラム注入口

初期圧力	ヘリウム、11.353 psi
初期温度	50 $^{\circ}\text{C}$
温度プログラム	オープントラックモード
カラム流量	ヘリウム、5 mL/min、定流量
カラム温度	
初期	50 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間
昇温レート 1	15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 180 $^{\circ}\text{C}$ まで 0 分間保持
昇温レート 2	7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 230 $^{\circ}\text{C}$ まで 0 分間保持
昇温レート 3	10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で 370 $^{\circ}\text{C}$ まで 10 分間保持
水素炎イオン化検出器	380 $^{\circ}\text{C}$

結果と考察

ワークベンチで前処理した EN14105 標準

3 つのモノグリセリドと標準グリセリドのリテンションタイムを、リテンションタイム標準のデータにより決定しました。このクロマトグラムを図 4 に示します。4 つの濃度レベルのグリ

セロールキャリブレーション標準から得られたデータを使用してグリセロールの検量線を作成しました。この検量線を図 5 に示します。この検量線の相関係数は 1.000 であり、EN14105 メソッドの要件である 0.9 を満たしています。

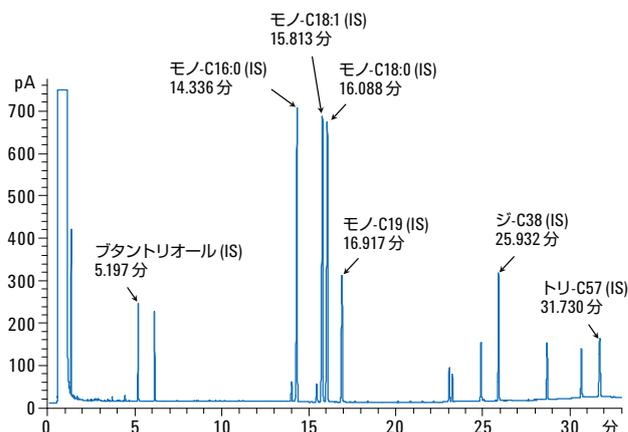


図 4. ワークベンチを使用して前処理したリテンションタイム標準による同定。3 つのモノグリセリドのほか、4 つの内部標準 (ブタントリオール、モノ-C19、ジ-C38、トリ-C57) もこの混合物に加えられました。

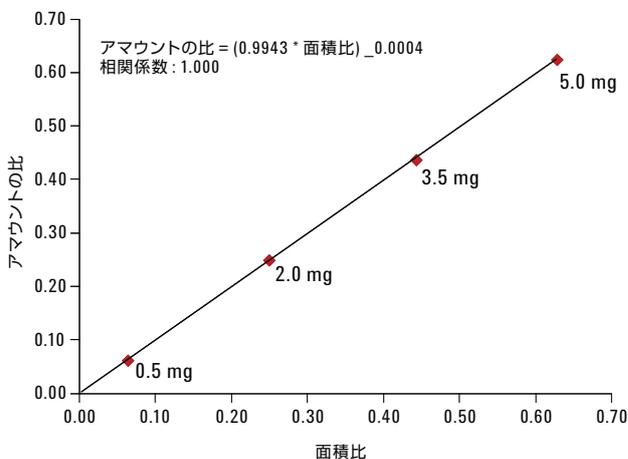


図 5. ワークベンチで前処理した 4 つのキャリブレーション標準から得られたデータを使用して作成したグリセロールの検量線。相関係数は、EN14105 メソッドで求められる 0.9 の値を超えています。

ワークベンチで前処理した B100 バイオディーゼルサンプル

ワークベンチで処理した 1 つのサンプルのクロマトグラムと 10 個のサンプルクロマトグラムの重ね書きを図 6 に示します。重ね書き表示した 10 個のクロマトグラムは、リテンションタイムとピーク応答のいずれも 1 つのクロマトグラムとほぼ同一です。この結果は、各サンプルを高精度で前処理できるワークベンチの能力を示しています。図 7 に 4 つの定量領域を詳細に示します。これらのクロマトグラムも、ワークベンチで前処理した 10 個のバイオディーゼルサンプルを重ね書きしたもので、ほとんど同一の結果を示しています。グリセロールとモノグリセリドの領域では、同定されたピークだけが定量され、報告されています。ジおよびトリグリセリドの領域では、対応する領域で溶出したすべてのピークが定量され、ジグリセリドまたはトリグリセリドとして報告されます。

最終的な結果を確認する前に、カラム性能のコントロールを計算する必要があります。このコントロールは、ジ-C38 内部標準とトリ-C57 内部標準の相対応答係数 (RRF) を計算することにより決定します。トリグリセリドを確実に検出するには、RRF が 1.8 未満でなければなりません。表 6 に示すように、ワークベンチで前処理した各サンプルは、このカラム性能のコントロールの条件を満たしていました。

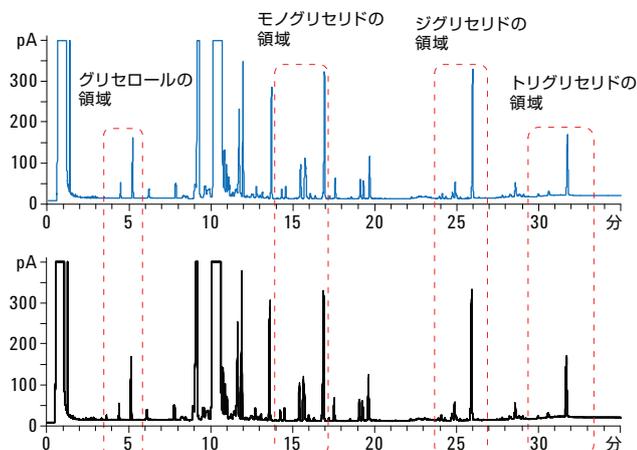


図 6. 上のクロマトグラムは、Agilent ワークベンチを使用して前処理した B100 サンプルを 1 回分析したものです。グリセロールおよびグリセリドの各定量領域を赤で示します。下のクロマトグラムは、ワークベンチを使用して前処理した 10 個のサンプルを重ね書きしたものです

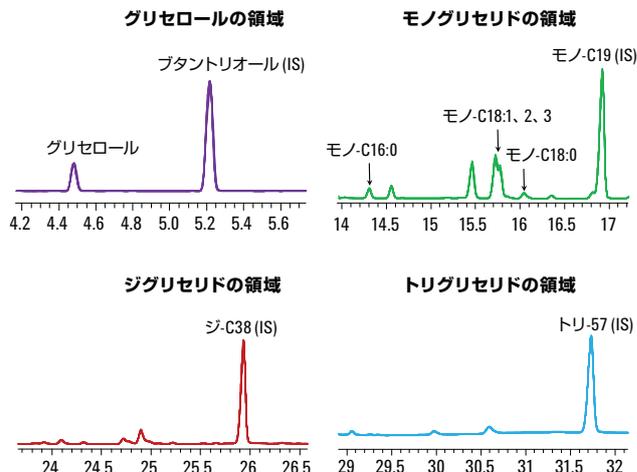


図 7. 4 つの定量領域の拡大図。これらのクロマトグラムは、Agilent ワークベンチを使用して前処理した 10 個のサンプルを重ね書きしたものです

表 6. カラム性能のコントロールパラメータ

サンプル	$A_{\text{DiC38}}/M_{\text{DiC38}}$	$A_{\text{TriC57}}/M_{\text{TriC57}}$	RRF
SRM01	24.4	16.5	1.5
SRM02	24.4	16.4	1.5
SRM03	24.4	16.4	1.5
SRM04	24.4	16.4	1.5
SRM05	24.5	16.5	1.5
SRM06	24.6	16.5	1.5
SRM07	24.5	16.0	1.5
SRM08	24.9	16.0	1.6
SRM09	24.9	16.0	1.6
SRM10	25.0	16.2	1.5

カラム性能のコントロールとして、ジ-C38 およびトリ-C57 内部標準の相対応答係数 (RRF) は 1.8 未満でなければなりません。ワークベンチで前処理した 10 個すべてのバイオディーゼルサンプルはこの要件を満たしています (A = ピーク面積、M = 化合物の質量)

グリセロールのキャリブレーションおよびカラム性能コントロールの基準を満たしている状態で、遊離グリセロール、モノ、ジ、トリグリセリドおよび総グリセロールを、ワークベンチで前処理した 10 個のバイオディーゼルサンプルについて算出しました。これらの結果を表 7 に示します。各成分について計算した低い RSD から、これらの 10 個の測定結果で優れた精度が得られていることがわかります。EN14105:2011 メソッドには、1 人のユーザーの精度に加えて複数のラボ間での精度についても記載があります。このアプリケーションノートでは、1 人のユーザーの結果であり、これをメソッドの基準と比較します。

1 人のユーザーの精度は繰り返し精度 (r) とも呼ばれます。繰り返し精度は、同じ装置で同じテストサンプルを使用し、同じオペレータによって得られた 2 つのテスト結果の違いです。EN14105 メソッドには、サンプルで測定される各成分の繰り返し精度の記載があります。これを用いる際に、最も差の大きい 2 つの結果 SRM01 および SRM10 を使用しました。サンプルの各結果の差の絶対値を取り、メソッドで求められる最小の差と比較しました。図 8 に示すように、ワークベンチを使用して前処理したサンプルは、定量されたすべての成分についてメソッドの繰り返し再現性の仕様を満たしています。

表 7. Agilent ワークベンチを使用して前処理した 10 個の B100 バイオディーゼルの分析結果

サンプル	サンプルの 重量 (mg)	重量 %				
		遊離グリセロール	モノグリセリド	ジグリセリド	トリグリセリド	総グリセロール
SRM01	10.90	0.016	0.39	0.14	0.19	0.156
SRM02	10.40	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM03	10.63	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM04	9.59	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM05	11.12	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM06	9.93	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM07	10.46	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM08	9.66	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM09	9.74	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
SRM10	10.01	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
	平均	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
	標準偏差	0.000	0.00	0.00	0.00	0.000
	RSD	1.871%	0.00%	0.00%	0.00%	0.202%

表 8. Agilent ワークベンチを使用して前処理した 2 種類の B100 バイオディーゼルサンプルの繰り返し精度 (r) で表した分析精度。各成分の繰り返し精度 (r calc) は EN14105:2011 メソッドの仕様 (r spec) を満たしています。

サンプル	重量 %				
	遊離グリセロール	モノグリセリド	ジグリセリド	トリグリセリド	総グリセロール
SRM01	0.016	0.39	0.14	0.19	0.156
SRM10	0.017	0.39	0.14	0.19	0.157
r calc	0.001	0.00	0.00	0.00	0.001
r spec	0.003	0.04	0.02	0.02	0.020

結論

改訂された EU メソッド EN14105:2011 に従って、Agilent 7696A ワークベンチはバイオディーゼルに含まれるグリセロール夾雑物質の GC 分析用標準およびサンプルの自動前処理を精度良く実行できることがわかりました。ワークベンチは 2 mL バイアルを使用するため、EN14105 の前処理のスケールが 10 分の 1 まで減少しました。この結果、この分析を実行する際の試薬のコストが下がり、廃棄される化学物質の量が減少しました。ワークベンチで前処理したキャリブレーション標準は、このメソッドにより設定されたすべての性能基準を満たしました。ワークベンチを使用してバイオディーゼルサンプルの前処理を 10 回繰り返したところ、GC 分析による結果は EN14105 メソッドの要件を超えるきわめて高い精度を示しました。

参考文献

1. DIN EN14105:2011-07 “Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of free and total glycerol and mono-, di-, and triglyceride contents”, European Committee for Standardization, Management Centre: Avenue Marnix 17: B-1000 Brussels.
2. “Automation of a Complex, Multi-Step Sample Preparation Using the Standalone Agilent 7696A WorkBench”, James D. McCurry, Agilent Technologies, Publication Number 5990-7525EN, March 1, 2011.
3. 「バッチモードによるサンプル前処理ワークベンチの機能向上」、Rebecca Veeneman、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-9271JAJP、December 21, 2011.
4. 「Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いたジェット燃料中 FAME 汚染物質の GC/MS 分析」、James D. McCurry、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-9717JAJP、January 12, 2012.

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web 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., 2012
Printed in Japan
February 24, 2012
5990-9893JAJP



Agilent Technologies