气相色谱法快速定量检测丙烯腈的生物催化产物

王铁钢[1]，罗 晖*[1]，朱燕勤[2]，于慧敏*[2]，杨慧芬[1]，沈忠耀[2]
(1. 北京科技大学环境工程系，北京 100083；2. 清华大学化学工程系，北京 100084)

摘 要：利用微生物催化丙烯腈生产丙烯酰胺在工业上已经得到了广泛的应用。生产中反应液同时含有底物丙烯腈、产物丙烯酰胺以及副产物丙烯酸。为了控制产品质量，需快速定量检测反应液中各组分。采用毛细管柱 PEG - 20M (30 m ×0.25 mm i.d.，2 μm)，以 20 g/L 的乙酰胺作为内标物对反应液进行气相色谱分析，优化分析条件为：进样口为 SPL，温度 260 ℃；FID 检测器，温度 260 ℃；柱温 190 ℃；载气为氮气，流速 25 cm/min；分流进样，进样量 0.4 μL，分流比为 50∶1。在 4 min 内，3 个组分得到完全分离，该方法具有良好的重现性和线性关系，回收率分别为 98.5 %、102.1 %、105.0 %，相对标准偏差分别为 9.1 %、5.3 %、1.7 %。该方法分析速度快，适合实验室与工厂生产中大量快速定量检测样品。

关键词：气相色谱法；快速定量检测；丙烯腈；丙烯酸；丙烯酰胺
中图分类号：O657.7 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-0720(2007)01-054-04

利用微生物产生的腈水合酶催化丙烯腈生产丙烯酰胺是成功应用微生物法来大规模生产大宗化学品的典范。在反应液中产物丙烯酰胺及副产物丙烯酸和底物丙烯腈共存，为测定酶促反应进行的程度及相应的酶活，需快速定量检测反应液中各种组分。对此反应体系，一般常用的检测方法是气相色谱法，孙旭东采用不锈钢填充柱(填料为 Porapak Q)进行分析，色谱峰较宽，分析时间需 8 min 左右[1]；尹志辉等[2]对丙烯酰胺中的微量杂质进行定量分析，分析时间比较长[3~5]。毛细管气相色谱法是近年来发展起来的一种分析手段，它具有较高的灵敏度和选择性，能够快速有效的确定多种物质的准确含量，且具有多种不同规格的毛细管柱可供选择[6]。为快速检测催化进程和酶活，本文经试验建立了一种简单快速的分析检测方法，采用毛细管柱 PEG - 20M，对反应体系中各组分的快速定量分析方法进行了研究。

1 实验

1.1 仪器与试剂

气相色谱仪 GC - 2010 (Shimadzu)，配备自动进样器及工作站。丙烯腈、丙烯酰胺、丙烯酸及乙酰胺均为分析纯。

1.2 操作条件

色谱柱为 PEG - 20M 毛细管柱(兰化所)，柱长 30 m，内径 0.25 mm，液膜厚度 2 μm；进样口为 SPL，温度为 260 ℃；采用 FID 检测器，温度为 260 ℃；柱箱温度为 190 ℃；载气为氮气，线速度为 25 cm/min；采用分流进样，进样量 0.4 μL，分流比为 50∶1。

1.3 标准溶液配制

准确称取 10 g 乙酰胺于 500 mL 的容量瓶中，去离子水溶解并定容，得 20 g/L 的内标物标准溶液，备用；同理配制丙烯酰胺标准溶液；分别取一定量的丙烯腈、丙烯酸，配制不同浓度的标准溶液备用。

* **收稿日期**：2006-04-17；**修订日期**：2006-07-10
基金项目：国家自然科学基金(20206014)；全国优秀博士论文作者专项(200345)项目资助
作者简介：王铁钢 (1982 -)，男，硕士研究生

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.4 实际样品的预处理

取一定体积的菌液，5000 r/min 下离心 10 min，弃上清液，得到菌体，生理盐水重悬菌体，同条件下离心取菌体，再次重悬于 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中，加入一定量的底物丙烯腈，28 ℃条件下振荡反应 20 min，准确加入 0.5 mL 6 mol/L HCl 终止反应，相同条件下离心，取上清液，与等体积乙酰胺溶液混匀，备用。

2 结果与讨论

2.1 条件实验

2.1.1 色谱柱的选择 选择不锈钢填充柱(填料为 Porapak Q，北分厂)、毛细管柱 SE - 30(北分厂)以及 PEG - 20M(兰化所)分别对样品进行了分析。结果表明：在分离度满足条件下，不锈钢填充柱分离度较大，但分析时间较长且色谱峰较宽，不适进行大量快速的检测；毛细管柱 SE - 30 的分离度较小，丙烯酸和乙酰胺色谱峰拖尾严重，其原因可能是该色谱柱为弱极性柱而样品为极性样品；毛细管柱 PEG - 20M 出峰保留时间短，色谱峰较窄且分离度大，适合用于大量分析。因此，选用毛细管柱 PEG - 20M。该柱参数为：柱长 30 m，内径 0.25 mm，液膜厚度 2 μm。

2.1.2 分析条件的确定 考察了进样口温度、柱温、检测器温度、载气线速度、分流比、进样量对分析效果的影响。柱温越高，峰间距越小，分离度越小，主要表现为丙烯酸和内标物乙酰胺分离度小，原因主要是因为丙烯酸会拖尾，这是由于其自身色谱性质决定；载气速度越大，出峰保留时间越小；分流比和进样量与峰面积大小呈正比关系。经试验，在保证出峰保留时间较小且峰之间有较好的分离度的条件下，确定了毛细管柱 PEG - 20M 的最佳色谱分析条件是：进样口温度 260 ℃、柱温 190 ℃、检测器温度 260 ℃、载气线速度 25 cm/min、进样量 0.4 μL、分流比 50 ∶1。

2.2 线性关系

取配制好的不同浓度标准溶液，等体积与内标溶液混匀，进样分析。以所测样品与乙酰胺的峰面积比对浓度比做标准曲线。在测定范围内，所测 3 种样品均具有良好的线性关系。对于丙烯腈：线性方程为 $Y = 0.01117 + 1.88036X$，相关系数 $r = 0.99995$；对于丙烯酸：线性方程为 $Y = -0.09334 + 1.31523X$，相关系数 $r = 0.9992$；对于丙烯酰胺：线性方程为 $Y = -0.3807 + 0.91212X$，相关系数 $r = 0.9992$。(Y 为峰面积比，X 为浓度比)。

2.3 回收率及精密度

配制不同浓度样品溶液，进行回收率及精密度实验。测定结果见表 1 及表 2。结果符合工业生产中定量分析的要求。当进样量为 0.4 μL 时，检出限(以 3 倍信噪比计)分别为 0.40、4.3、2.1 mg/L。

表 1 回收率及检出限

Tab. 1 Recovery and detection limit

组分	加入量 ρ/(g/L)	测定量 ρ/(g/L)	回收率 /%	检出限 ρ/(mg/L)
丙烯腈	16.00	15.76	98.50	0.4
丙烯酸	21.00	21.44	102.1	4.3
丙烯酰胺	50.00	52.51	105.0	2.1

表 2 测定结果的精密度

Tab. 2 Precision the measuring results

组分	测定值 ρ/(g/L)					平均值 ρ/(g/L)	RSD/%
丙烯腈	11.38	10.52	8.97	9.53	10.51	10.19	9.1
丙烯酸	24.31	23.28	22.75	24.84	26.03	24.24	5.3
丙烯酰胺	172.4	167.8	168.7	174.63	172.19	171.1	1.7

2.4 实际样品的测定

微生物菌体的腈代谢酶系有腈水解酶和腈水合酶，分别催化丙烯腈生成丙烯酸和丙烯酰胺。经过一定时间培养得到的菌体在 pH 为 7.0 的 50 mmoL 磷酸盐缓冲溶液中对丙烯腈进行催化，得到的反应液中含有少量剩余底物丙烯腈、副产物丙烯酸及产物丙烯酰胺，反应液与乙酰胺标准液等体积混合，以本实验所确定条件进行气相色谱分

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

析，分析结果如图 1 及图 2 所示。

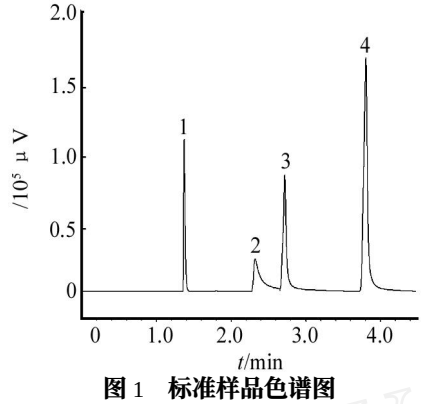

图 1　标准样品色谱图

Fig. 1　Chromatogram of the standard sample

1 - 丙烯腈；2 - 丙烯酸；3 - 乙酰胺；4 - 丙烯酰胺

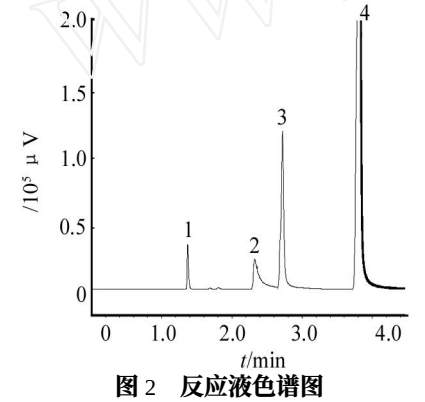

图 2　反应液色谱图

Fig. 2　Chromatogram of the reaction solution

1 - 丙烯腈；2 - 丙烯酸；3 - 乙酰胺；4 - 丙烯酰胺

由图 2 中知，该方法能快速准确的检测出实际反应液中 3 种组分的量，检测样品中丙烯酰胺含量远远高于丙烯酸含量，说明诺卡氏菌中的腈水合酶酶活远高于腈水解酶酶活，符合丙烯酰胺生产的实际情况。

3　结论

经试验，采用毛细管柱 PEG - 20M (30 m × 0.25 mm i. d. , 2 μm)，以 20 g/L 的乙酰胺溶液作为内标物对混合物进行气相色谱分析，优化分析条件为：进样口为 SPL，温度 260 ℃; FID 检测器，温度 260 ℃; 柱温 190 ℃; 载气为氮气，流速 25 cm/min；分流进样，进样量 0.4 μL，分流比为 50 ∶1，该方法能在 4 min 中内完成分析过程，且精密度高、重现性好、简单可靠，适合实验室和工业生产中的短时间内大量样品的快速定量检测，可大大提高生产分析效率。若仅定性分析，可去掉内标物乙酰胺并使柱箱温度升至 210 ℃甚至更高，分析时间可缩短至 3 min 以内。

参考文献

[1] 孙旭东. 膜生物反应器游离细胞催化体系生产丙烯酰胺的研究：[学位论文]. 北京：清华大学化学工程系，2004

[2] 尹志辉，刘　建，张淑贤等. 分析化学，1995，23 (12)：1436

[3] L E Baksanova，V A Val′tsifer，V I Budnikov. Russian Journal of Applied Chemistry，2002，75(9)：1427

[4] 于桂霞，陈红军. 色谱，1994，12(1)：76

[5] 仲维科，陈冬东，刘志明. 色谱，2005，23(3)：312

[6] 修振佳，张桐凤，罗春荣. 色谱，1995，13(6)：468

Quickly quantitative detection of acrylonitrile′s biocatalysis products by gas chromatography

WANG Tie-gang[1]，*LUO Hui*[*1]，*ZHU Yan-qin*[2]，*YU Hui-min*[2]，*YANG Hui-fen*[1] and *SHEN Zhong-yao*[2] (1. Department of Environmental Engineering，University of Science and Technology Beijing，Beijing 100083；2. Department of Chemical Engineering，Tsinghua University，Beijing 100084)，Fenxi Shiyanshi，2007，26(1)：54～57

Abstract：Products of acrylamide from acrylonitrile with microbial enzymes as the biocatalyst has recently become popular in industry. During the biotransformation process，substrate acrylonitrile，product acrylamide and by-product acrylic acid will be simultaneously present in the reaction solution. In this study，a capillary column PEG - 20M (30 m ×0.25 mm i. d. , 2 μm) was selected to quantitatively measure the concentrations of acrylonitrile，acrylic acid and acrylamide，with acetamide as the inner standard. The optimal temperatures of the SPL sample receiver，the FID detector and the column were determined to be 260，260 and 190 ℃，respectively，with nitrogen as the carrier at the speed of 25 cm/min. The injection volume of the sample was set at 0.4 μL with the shunting ratio of 50 ∶1. Final results showed that the three targets can be completely separated within 4 min，with high reproducibility and linearity. The reoveries of acrylonitrile，acrylic acid and acrylamide reached as high as 98.5 %，102.1 % and 105.0 %，with the relative standard deviation of 9.1 %，5.3 % and 1.7 %，respectively. These results show this method is simple，

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

accurate and has a very promising prospect in the high-throughput quantitative analyses of acrylonitrile , acrylamide and acrylic acid in both lab and industry.

Keywords: Gas chromatography; Quantitative detection; Acrylonitrile; Acrylic acid; Acrylamide

www.cnki.net

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net