

折射法与定时进样气相色谱法快速测定 丙烯酰胺和丙烯腈

孙旭东 于慧敏* 史悦 沈忠耀

(清华大学化工系生物化工研究所, 北京 100084)

摘 要 为了满足游离细胞催化、多级膜生物反应器连续转化生产丙烯酰胺的新工艺对丙烯酰胺和丙烯腈浓度进行监控的需要, 分别提出了采用阿贝折射仪快速分析丙烯酰胺和定时进样气相色谱外标法快速分析丙烯腈浓度的新方法。与传统的丙烯酰胺和丙烯腈的气相色谱内标方法相比, 新方法在保持原有气相色谱分析精度的基础上, 显著提高了分析的时效性, 可以对各级成分变化做准确及时的分析和监控, 从而保证了多级膜反应器连续转化过程的操作稳定性。

关键词 丙烯酰胺, 丙烯腈, 折射法, 定时进样气相色谱法

1 引 言

丙烯酰胺 (Acrylamide, AM) 是一种用途广泛的有机化工原料, 目前主要采用丙烯腈 (Acrylonitrile, AN) 微生物转化法进行水合反应而生产 [1, 2]。工业生产中所采用的工艺主要是以固定化细胞颗粒作为生物催化剂, 并在搅拌反应罐内进行间歇式反应, 存在固定化细胞容易破碎, 生产过程不连续, 产品质量不稳定等问题。采用游离细胞代替固定化细胞, 采用连续化生产方式代替间歇批式生产方式, 已经成为微生物转化法生产丙烯酰胺的重要发展方向 [3]。

本课题组成功开发了丙烯酰胺的游离细胞催化与膜反应分离耦合的多级连续化生产新工艺 [4, 5]。为了使各级反应过程保持稳定, 需要对每一级的丙烯酰胺和丙烯腈浓度进行及时的分析和监控。丙烯酰胺和丙烯腈的传统分析方法为气相色谱内标法, 具有较高的精度, 但仅测定一个样品就需要 12 ~ 15 min, 无法满足多级连续化操作过程中在短时间内测定大量样品的要求。虽然有文献报道应用近红外光谱分析可以实现丙烯酰胺和丙烯腈的在线检测和控制 [6, 7], 但设备投资较大, 不适于普遍推广应用。

本实验建立了采用阿贝折射仪快速测定丙烯酰胺浓度和采用定时进样气相色谱外标法快速测定丙烯腈浓度的新方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

GC-9AM 气相色谱仪 (日本岛津公司); 阿贝折射仪 (2W, 上海光学仪器厂) 的温度采用恒温循环器 HX-10555 (四环科学仪器厂) 控制在 20。丙烯腈 (上海试剂三厂) 为化学纯; 丙烯酰胺 (北京化学试剂公司) 和乙酰胺 (北京亚太精细化工公司) 均为分析纯。

2.2 传统气相色谱内标法

气相色谱柱为长 2 m 的不锈钢柱, 采用的填料为 Porapak Q, 用氢离子火焰检测样品; 柱温、进样口的温度和检测器的温度分别为 200、240 和 240; 载气流速为 30 mL/min。内标物为乙酰胺。

3 结果与讨论

3.1 气相色谱内标法测定丙烯酰胺和丙烯腈的含量

在传统的固定化工艺和新建的单级非稳态和多级拟稳态丙烯酰胺生产工艺中, 均采用 GC 内标法测定丙烯酰胺和丙烯腈的浓度, 具有很好的分析精度。丙烯酰胺和丙烯腈的 GC 内标法分析谱图和标

2004-11-25 收稿; 2005-03-02 接受

本文系国家自然科学基金青年基金 (20206014) 和全国优秀博士学位论文作者专项资金资助项目 (200345)

准曲线如图 1 所示。

在内标法条件下分析一个样品,从取样到加内标物以及进行气相色谱分析结束超过 10 min,仅能满足酶催化反应研究中单级批式反应过程的监控要求。但是,由于多级膜反应器具有反应级数多、过程连续、需要实时监控各级反应罐中的多个底物和产物浓度等特点,原有的气相色谱内标法已经不能满足需要。为此,本实验分别采用了折射法和定时进样气相色谱法进行丙烯酰胺和丙烯腈的快速检测。

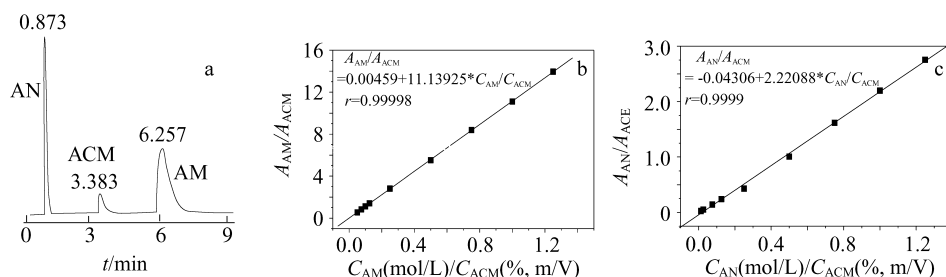


图 1 气相色谱内标法分析丙烯酰胺和丙烯腈的谱图 (a), 丙烯酰胺标准曲线 (b) 和 丙烯腈标准曲线 (c)

Fig 1 Analysis of acrylamide (AM), acrylonitrile (AN) acetamide (ACM, internal standard) by internal-standard gas chromatographic (GC) method (a) and the corresponding AM (b) and AN (c) standard curves

3.2 折射法快速测定丙烯酰胺的浓度

阿贝折射法原理是在一定的浓度范围内丙烯酰胺的浓度和其折射率呈线性关系,通过测定溶液的折射率可以确定丙烯酰胺浓度。对丙烯酰胺水溶液的研究结果表明,当丙烯酰胺在 50 ~ 500 g/L 的浓度范围内变化时,其浓度和折射率均有很好的线性相关性,相关系数达到 0.9998,完全能够达到工艺过程分析监控的要求。然而,在多级连续化反应体系中,不仅存在高浓度的丙烯酰胺,还存在一定量的丙烯腈 (小于 3%) 和游离细胞以及细胞自溶后产生的生物杂质等。在实际分析过程中为了提高分析效率不可能将这些物质分离后再分析,因此,必须研究这些物质的存在对于应用阿贝折射仪测定丙烯酰胺浓度的影响。实验结果如图 2 所示。

图 2 给出了丙烯酰胺水溶液的标准曲线和含有 1% (V/V) 丙烯腈的水溶液的标准曲线的比较。由图 2 可见,两条标准曲线基本重合,相关系数均达到 0.9999 左右,说明体系中含有低浓度的丙烯腈基本不影响丙烯酰胺的测定。由图 2 还可发现,当丙烯腈浓度在 0 ~ 5% 范围内变化时,其折射率的变化均很小。因此,在实际的多级连续化反应体系中,由于各级丙烯腈浓度一般不超过 3%,所以丙烯腈的干扰可以基本排除。进一步考察游离细胞的存在对丙烯酰胺浓度测量的影响。结果表明,当光密度 OD_{460} 在 0 ~ 55 (1 个 OD_{460} 单位对应的菌体浓度为 0.1134 g(干重)/L) 的较大范围内变化时,含 300 g/L 丙烯酰胺的水溶液的折射率均保持恒定,说明在多级膜反应器连续转化的游离细胞反应体系中,游离细胞的存在也不会对丙烯酰胺浓度的测量产生明显干扰。

总之,从上述实验可以看出,用阿贝折射仪快速测定多级膜反应器连续转化过程中的丙烯酰胺浓度是可行的。一般来说,测定一个样品仅需 1 min。因此,对一个六级连续化过程进行分析监控,用阿贝折射仪测定 6 个样品的时间不到 10 min,而用 GC 内标法测定则需要 1 h 以上。

3.3 定时进样气相色谱外标法快速测定丙烯腈浓度

在六级连续转化膜反应体系中,为了保持各级酶反应的活性和稳定性,底物丙烯腈在各级反应釜中的加入情况必须进行及时分析和监控,以防止丙烯腈浓度过高导致体系内游离细胞的严重失活。

在六级连续转化膜反应新工艺中,高浓度的丙烯酰胺产物可以采用阿贝折射仪来快速测定。由于体系中丙烯腈的浓度很低,因此折射法不能适用于丙烯腈的快速分析。考虑到在气相色谱内标法分析

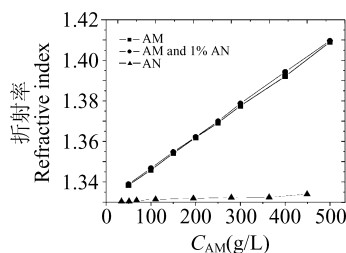


图 2 丙烯腈和游离细胞对于折射法测定丙烯酰胺浓度的影响

Fig 2 Effects of AN and free-cells to analysis of AM by refraction method

丙烯腈浓度的过程中,丙烯腈的保留时间不到 1 min,且峰形很陡,拖尾时间很短,因此,对于丙烯腈浓度的快速分析,可以采用气相色谱定时进样的外标方法,每隔 30 s 进一个样品。由于丙烯酰胺的出峰时间在 6 min 以后,因此,从理论上讲,只要快速进样的数量小于 10 个,那么第一个样品的丙烯酰胺峰就不会对最后一个样品的丙烯腈峰产生影响。实验证实,采用 30 s 定时进样的气相色谱法,同时对 6 个反应级中的丙烯腈样品含量进行快速分析是完全可行的(图 3),6 个样品的分析在 4 min 内就可以全部完成。若采用原来的气相色谱内标法,则需要 1 h 以上。进一步做出新方法测定丙烯腈浓度的标准曲线,其回归方程为: $A(\text{峰面积}, \times 10^6) = -0.0925 + 1.1612C_{AN}(\%, V/V)$, 相关系数为 0.9999。

本研究分别建立了折射法和定时进样的气相色谱外标法,进行丙烯酰胺和丙烯腈浓度的快速分析。结果表明,采用阿贝折射仪的折射方法可以快速、准确地分析发酵液中的丙烯酰胺含量;采用定时进样的气相色谱外标法能够在 4 min 内完成 6 个样品的丙烯腈含量分析,从而满足了游离细胞催化、膜反应器六级连续转化丙烯腈生产丙烯酰胺过程中对各级反应体系的操作参数进行控制,最终实现稳定连续操作的需要。新方法简洁快速,保持了较高的精度,能够及时准确地分析各级体系中的产物和底物浓度,从而具有很强的实用性。

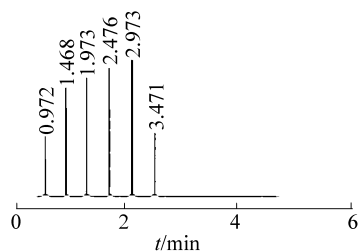


图 3 六级连续转化操作过程中丙烯腈浓度的定时进样气相色谱快速分析

Fig 3 Quick analysis of AN by timed-GC method

References

- 1 Asano Y, Yasuda T, Tani Y, Yamada H. *Agric Biol Chem.*, **1982**, 46: 1183 ~ 1189
- 2 Shen Yinchu (沈寅初), Zhang Guofan (张国凡), Han Jiansheng (韩建生). *Industrial Microbiology (工业微生物)*, **1994**, 24(2): 24 ~ 32
- 3 Sun Xudong (孙旭东), Shi Yue (史悦), Yu Huimin (于慧敏), Shen Zhongyao (沈忠耀). *Modern Chemical Industry Monthly (现代化工)*, **2003**, 23: 42 ~ 44
- 4 Sun X D, Shi Y, Yu H M, Shen Z Y. *Biochem. Eng. J.*, **2004**, 18(3): 239 ~ 243
- 5 Sun Xudong (孙旭东), Shi Yue (史悦), Yu Huimin (于慧敏), Shen Zhongyao (沈忠耀). *Journal of Chemical Industry and Engineering (China) (化工学报)*, **2004**, 1: 81 ~ 86
- 6 Dadd M R, Sharp D C A, Petman A J, Knowles C J. *J. Microbiol Methods*, **2000**, 41: 69 ~ 75
- 7 Duanmu Mian (端木勉). *Chem. Eng. Guangzhou (广州化工)*, **1998**, 26(2): 74 ~ 76

Quick Analysis of Acrylamide and Acrylonitrile by Refraction Method and Timed Gas Chromatography

Sun Xudong, Yu Huimin*, Shi Yue, Shen Zhongyao

(Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract A new technique for producing acrylamide, in which continuous bioconversion of acrylonitrile was accomplished using multi-stage membrane bioreaction with free cells as biocatalyst has been developed. For meeting the demand of stable operation of the continuous process, a novel refraction method and timed gas chromatography (GC) were respectively constructed to quickly and accurately analyze the concentration of acrylamide and acrylonitrile in different stages. Compared with the original internal-standard GC, the refraction method and the timed GC method not only maintained the accuracy but also highly improved the time efficiency, thereafter ensured the operation stability of the new continuous bioconversion of acrylamide.

Keywords Acrylamide, acrylonitrile, refraction method, timed gas chromatography

(Received 25 November 2004; accepted 2 March 2005)