

HPLC 柱前衍生法 2-氨基乙磺酸制备工艺 还原阶段流程诊断

毛建卫¹,崔艳丽²,万长春²,李菊清¹

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学系,浙江 杭州 310012;

2. 浙江大学 化学系,浙江 杭州 310027)

摘要:建立了利用 HPLC 柱前衍生对 2-氨基乙磺酸制备工艺还原阶段的流程诊断方法,2-氨基乙磺酸工艺中还原阶段中 2-氨基乙磺酸的产率可达 91%,流程分析诊断结果表明 HPLC 可靠易行,便于对工艺流程的监控。

关键词: HPLC;柱前衍生;流程诊断;2-氨基乙磺酸

中图分类号: O658

文献标识号: A

文章编号: 1671-8798(2003)S0-0068-03

2-氨基乙磺酸($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$)又称为牛磺酸,是一种含硫非蛋白质氨基酸,属人体内最重要的氨基酸之一,因它参与并保证婴幼儿的正常生长发育、具有特殊的药理作用和生理功能^[1,2]而被广泛重视。我国 2-氨基乙磺酸生产工艺成本较高,迫切需要对其生产工艺进行有效改进^[3]。本文利用产品制备的关键步骤还原反应工艺中 2-氨基乙磺酸与 2,4-二硝基氟苯发生衍生化反应^[4,5],且衍生产物在 360 nm 处有紫外吸收,采用 HPLC 柱前衍生法能对工艺流程进行有效监测,在 2-氨基乙磺酸制备工艺的还原阶段,产率可达 91%。结果表明,该方法可靠易行,便于对工艺流程的监控。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

WATERS 高效液相色谱仪、紫外检测器、超声波发生器。乙醇胺、20%发烟硫酸、无水碳酸钠、无水亚硫酸钠、磷酸氢钾、氢氧化钠、碳酸氢钠均为化学纯。2-氨基乙基硫酸酯为自制。2,4-二硝基氟苯(DNFB)、2-氨基乙磺酸(SIGMA)为生化试剂。甲醇、乙腈为 HPLC 级。

1.2 分析和测试

1.2.1 样品制备:加入亚硫酸钠水溶液,抽真空,充氮气,加热至 100℃,将所制的 2-氨基乙基硫酸酯在 3 h 内加入,10 min 后取样 1 mL,稀释至 100 mL,为样品 A₄。然后分别在投料后 2,16,20,24 h 取样 1 mL,稀释至 100 mL,为样品 A₅,A₆,A₇,A₈。将反应后的悬浮液趁热过滤,滤液 80℃下减压脱水至有大量晶体产生,再趁热过滤,滤液 32℃结晶,等晶体长好后过滤,滤饼为 2-氨基乙磺酸粗品,滤液留作母液,取样 1 mL,稀释至 100 mL,为样品 A₉。

将母液适量水配亚硫酸钠水溶液,抽真空,充氮气,加热至 100℃,将所制的 2-氨基乙基硫酸酯加入,再在同样的时间取样、处理,分别为样品 B₄,B₅,B₆,B₇,B₈,B₉。将此反应循环再做两次,分别取样 C₄~C₉、D₄

收稿日期:2003-09-25

基金项目:本课题为浙江省重点科技计划项目资助(编号:2002c21018)。

作者简介:毛建卫(1964—),男,浙江宁波人,高级工程师,主要从事生物化工、药物和食品添加剂的研究。

~D₉。

1.2.2 分析测试:

测量原理:在碱性条件下,2-氨基乙磺酸中的氨基能定量与2,4-二硝基氟苯反应生成二硝基苯氨酸衍生化产物,在360 nm处有最大吸收。

柱前衍生:取样品0.1 mL于5 mL容量瓶中,滴加1 mL 0.5 mol/L碳酸氢钠溶液和0.1 mL衍生化试剂,摇匀,置于60℃的水浴中避光加热30 min,反应完全后超声波脱气,再用磷酸盐缓冲液稀释至刻度。

色谱条件:Dismonsil(TM)-C18柱4.6 mm×150 mm,5 μm。流动相为乙腈 磷酸盐缓冲液(pH=7)=20:80;流速:1.0 mL/min;柱温:室温;检测波长:360 nm;吸收度范围:0.1 AUFS;进样量:10 μL。

标准曲线的绘制:分别取2-氨基乙磺酸标准品0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4 mL如前操作,进样10 μL,每点进样两次,取平均值。以峰面积Y对2-氨基乙磺酸浓度和2-氨基乙基硫酸酯浓度X(μg/mL)进行线性回归。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

不同的流动相对分离效果的影响如表1所示。当极性溶剂乙腈浓度增大时,各成分的保留时间减小,第一种流动相极性溶剂比例太小,而待分离组分极性都较大,所以在1 h内无法有效分离;第二种虽然能有效分离但保留时间相对来说较大,不利于试验进行;第四种流动相DNFB-OH与2-氨基乙磺酸保留时间相差较小,误差较大,第三种流动相分离效果较好,选择这组进行后继试验。

表1 流动相对R_t的影响

序号	流动相	比例/V	R _t /min		
			DNFB-OH	2-氨基乙磺酸	氨基乙基硫酸酯
1	乙腈:磷酸盐:水	5:65:30	37.75	>60	>60
2	乙腈:磷酸盐:水	15:15:70	13.38	23.20	39.53
3	乙腈:磷酸盐	20:80	7.12	10.37	16.14
4	乙腈:磷酸盐	30:70	3.39	4.93	8.54

注:DNFB-OH为2,4-二硝基氟苯的水解产物。

2.2 流程诊断

(1) 2-氨基乙磺酸标准品测试并进行线性回归,其回归方程为: $Y=418\,945X+356\,644$,相关系数 $r=0.997\,9$,线性范围为8.72~61.04 μg/mL,线性关系很好。

(2)中和脱水后的酯化物平均分成两份在N₂保护下还原,取样所测结果见表2。由表2可知,还原反应时间在16 h时反应产率达到最大值,当反应超过16 h后,产率降低,2-氨基乙磺酸水解,反应逆向进行,反应体系存在以下平衡:



表2 还原各阶段转化率和产率

No.	样品号	牛磺酸浓度 (μg/mL)	牛磺酸产率 (%)	No.	样品号	牛磺酸浓度 (μg/mL)	牛磺酸产率 (%)
1	A ₄	5.031 2	20.8	13	A ₇	26.548 2	80.8
2	B ₄	17.595 9	26.1	14	B ₇	44.661 2	65.1
3	C ₄	13.747 7	31.3	15	C ₇	24.762 3	63.2
4	D ₄	14.236 1	37.2	16	D ₇	23.355 1	68.3

续表

No.	样品号	牛磺酸浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	牛磺酸产率 (%)	No.	样品号	牛磺酸浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	牛磺酸产率 (%)	
5	反应 2h	A ₅	11.459 8	46.2	17	A ₈	25.512 8	71.3
6		B ₅	23.593 1	44.9	18	B ₈	47.893 5	59.5
7		C ₅	16.652 9	46.5	19	C ₈	25.677 3	60.6
8		D ₅	15.906 8	46.6	20	D ₈	24.264 5	67.4
9	反应 16h	A ₆	28.539 7	90.9	21	A ₉	29.059 5	—
10		B ₆	47.210 5	81.6	22	B ₉	24.057 2	—
11		C ₆	26.389 6	77.5	23	C ₉	22.119 3	—
12		D ₆	24.199 0	79.3	24	D ₉	19.116 5	—

(3)此反应除了上述建立平衡的反应外,还有副反应发生。反应初始阶段体系澄清,随着反应的进行,溶液颜色变黄变深,因为上述平衡中物质的水溶液中皆为澄清,可推断反应中有其他物质产生。在样品的气相色谱图上,保留时间为 9.8 min 处出现一色谱峰,经检测可知不是乙醇胺和 2,4-二硝基氟苯的衍生物,综合各物质的性质,推测出现的副产物为乙醇胺的氧化物。当反应平衡建立后,继续反应,乙醇胺易氧化,体系平衡被破坏,反应向左移动,则 2-氨基乙磺酸产率降低。

参考文献:

- [1] 龚盛昭,牛磺酸的功能和合成新工艺研究[J]. 广州食品工业科技,1999,16(4):42-45.
- [2] 宋力,孟英韬. 用高效液相色谱仪柱前衍生物法测定血浆氨基酸[J]. 诊断技术,1993,(3):567-569.
- [3] 汤志刚,周荣琪,段占庭,应用薄层色谱对牛磺酸生产工艺进行流程诊断[J]. 精细化工,1999,16(4):17-19.
- [4] Lewis P A, Woodward A J, Maddock J, . High-performance liquid chromatographic assay for the N-acetylcysteine in plasma and urine[J]. J. Phar. Sci,1984,73(7):996-998.
- [5] P. A. Lewis, A. J. Woodward, J. Maddock. . Improved method for the determination of N-acetylcysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography[J]. J. Chrom,1985,327:261-267.

Process diagnosis for reduction reaction of 2-aminoethansulfonic processing by HPLC pre-column derivatization

MAO Jian-wei¹, CUI Yan-li², WAN Chang-chun², LI Ju-qing¹

(1. Zhejiang University of science and technology, Hangzhou 310012, China

2. Dept. of chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract: An analytical method has been developed for the process diagnosis in the synthesizing reaction of 2-aminoethansulfonic by HPLC. The result of process diagnosis indicates the yields of reduction stage being at 91%. The method is simple and feasible for controlling the reaction.

Key words: HPLC; pre-column derivatization; process diagnosis; 2-aminoethansulfonic