

乙醇-水混合溶剂中 5'-尿苷酸二钠的结晶介稳区

张 磊, 应汉杰, 吕 浩, 马 骏

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘要: 采用双光路激光法, 在 293.2~318.2 K 温度范围内, 研究了 5'-尿苷酸二钠在不同比例乙醇-水混合溶剂中的溶解与超溶解特性, 得到了 5'-尿苷酸二钠的结晶介稳区。采用 λh 方程关联了 4 个体系的溶解度数据, 进而分别求得各体系下的混合焓和结晶焓。同时, 探讨了搅拌转速、pH 值和钠离子浓度对结晶介稳区的影响。实验结果表明, 与温度相比较, 乙醇质量分数是影响溶解度和超溶解度的主要因素; 随乙醇质量分数的增大, 5'-尿苷酸二钠的溶解度和超溶解度显著减小; 在相同条件下, 溶液 pH 值和钠离子浓度的升高, 以及搅拌转速的降低均会增大 5'-尿苷酸二钠结晶介稳区的宽度。

关键词: 5'-尿苷酸二钠; 溶解度; 介稳区; λh 方程

中图分类号: TQ 465.1; TQ 026.5

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2008) 06-1348-06

Metastable zone of 5'-UMPNa₂ in ethanol-aqueous mixture

ZHANG Lei, YING Hanjie, LÜ Hao, MA Jun

(School of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, Jiangsu, China)

Abstract: The dual circuits laser detector was used to measure the solubility and super-solubility of uridine-5'-monophosphate disodium salt in the ethanol-aqueous mixture of different ethanol mass fractions at 293.2—318.2 K. In addition, the effects of agitation rate, pH value and Na⁺ concentration on the width of metastable zone were explored respectively. It was found that the solubility data might be described well by the model of λh equation; furthermore the mixing enthalpy and the crystallization enthalpy of uridine-5'-monophosphate disodium salt in mixture were determined. Similar to the solubility, the super-solubility increased with the increase of temperature and decreased with the increase of ethanol mass fraction. Under the same experimental conditions, increase of pH value, Na⁺ concentration or decrease of agitation rate might broaden the width of metastable zone.

Key words: uridine-5'-monophosphate disodium salt; solubility; metastable zone; λh equation

引 言

分子生物学、遗传学和生物化学的大量研究结果表明, 5'-尿苷酸不仅是细胞功能与生长的基础物质, 而且是机体呼吸、循环、生殖和神经系统中

大量生物信息传递和调节的重要活性物质^[1]。可用于治疗肝炎, 改善冠心病、风湿性关节炎、白细胞减少症状等^[2]。还可作为前体制造尿苷三磷酸、腺腺尿、尿苷二磷酸-葡萄糖^[3]、双脱氧肌苷等药物。

目前, 国内 5'-尿苷酸二钠盐 (以下简称尿苷

2007-10-10 收到初稿, 2008-03-18 收到修改稿。

联系人: 应汉杰。第一作者: 张磊 (1971—), 男, 博士研究生, 工程师。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2007CB714305)。

Received date: 2007-10-10.

Corresponding author: Prof. YING Hanjie. E-mail: yinghanjie134@163.com

Foundation item: supported by the National Basic Research Program of China (2007CB714305).

酸二钠, UMPNa₂) 工业生产普遍采用溶析结晶法, 由于缺乏时变性热力学数据, 无法有效地对结晶过程优化和设计, 存在结晶收率低、生产成本低、一次结晶无法满足药用指标要求等问题, 在国际市场缺乏竞争力。因此, 有必要对尿苷酸二钠结晶的热力学性质进行系统的研究。

结晶过程是复杂的多相传热、传质过程, 固液平衡溶解度、介稳区宽度和结晶焓是结晶热力学研究的基础, 也是结晶器设计和生产操作所必需的^[4]。目前介稳区的测定主要有电导率法^[5]、量热法^[6]、密度法^[7]以及激光法^[8]等。其中激光法动态响应快、灵敏度与准确度高、简便易行、适用范围广, 为此本文采用双光路激光法测定了尿苷酸二钠在纯水及不同比例的乙醇-水混合溶剂体系中的溶解度及介稳区宽度, 并采用 λh 方程对溶解度数据进行关联, 进而求得各体系下的混合焓和结晶焓。

1 实验

1.1 实验试剂

实验用尿苷酸二钠由南京同凯兆业生物技术有限公司提供(纯度 > 99%), 水为实验室自制去离子蒸馏水。其他原料均为市售分析纯试剂。

1.2 实验仪器及装置

实验仪器: BS-110 S 分析天平 (Sartorius); PHS-3C 型精密 pH 计 (上海雷磁仪器厂); SZ-97 自动三重纯水蒸馏器 (上海亚荣生化仪器厂)。

尿苷酸二钠熔点测定采用德国 NETZSCH 公司的 STA 409 PG/PC 型热分析仪, 氮气流速 15 ml · min⁻¹, 以 10 °C · min⁻¹ 从室温升温至 250 °C。

尿苷酸二钠在不同温度下, 不同比例的乙醇-水混合溶剂中的溶解度和过饱和度测定装置见文献^[9], 采用 $\phi 4$ cm 标准六直叶搅拌桨。装置的灵敏度和数据重现性良好, 3 次重复测试数据的最大偏差小于 1%。伍川等^[10] 利用该装置测定的测量数据, 对硝酸钾晶体线性生长速率模型进行求解, 所得动力学参数与文献报道一致。

1.3 溶解度的测定

准确称量尿苷酸二钠, 倒入恒温的夹套结晶器中, 缓慢滴加溶剂, 同时开启搅拌和启动计算机控制与数据采集系统, 记录溶剂用量。随着溶质逐渐溶解, 晶体散射和衍射效应越来越弱, 当入射光和透射光信号趋近一致时表明固体溶质全部溶解^[11]。考虑到信号滞后现象, 溶剂用量的确定采用切

线法。

1.4 结晶过程过饱和度的测定

配制一定浓度的尿苷酸二钠水溶液, 在测试温度下恒温约 15 min, 以 0.1 ml · min⁻¹ 的速率缓慢流加溶剂。同时开启搅拌和启动计算机控制与数据采集系统。当透射光强度出现拐点, 偏离入射光强度信号时, 表明有新相形成, 此时溶剂的加入量即可用于超溶解度的计算。改变尿苷酸二钠水溶液的浓度和实验温度, 重复上述步骤, 即可得到不同溶剂浓度和温度下的超溶解度。每个实验点重复 3 次, 取其平均值。

2 结果与讨论

2.1 平衡溶解度

尿苷酸二钠溶解度随温度和乙醇质量分数变化的曲线如图 1 所示。其溶解度随温度升高而增加, 随乙醇质量分数的增加而减小。当乙醇含量较低时, 溶解度随乙醇质量分数变化显著。其原因可能与混合溶剂的介电常数随乙醇含量的增加而减小有关, 介电常数的降低减小了混合溶剂的溶剂化能力, 从而降低了尿苷酸二钠的溶解度。

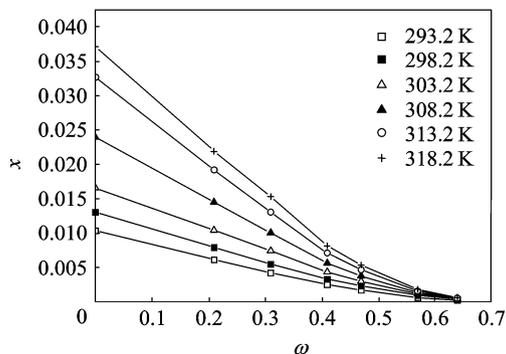


图 1 尿苷酸二钠溶解度随乙醇质量分数和温度的变化

Fig. 1 Solubility variation with ω and temperature

2.2 溶解度关联及结晶混合焓

尿苷酸钠分子中含有多个羟基和羰基, 易与水氢键结合, 形成缔合体系。考虑到各种固-液平衡模型的适用范围, 本文选用 λh 方程^[12] 来关联尿苷酸二钠在乙醇-水混合溶剂中的溶解度数据, 结果见表 1。

$$\ln\left(1 + \lambda \frac{1-x}{x}\right) = \lambda h \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right) \quad (1)$$

式中 λ 为平均缔合度, 而 h 与单位溶质的熔化焓存在如下关系

$$hR = \Delta H_m + \frac{\Delta H_E}{x} \quad (2)$$

表 1 尿苷酸二钠在不同乙醇-水混合溶剂中溶解度的实验值及溶液的摩尔混合焓的计算值

Table 1 Solubility of UMPNa₂ in ethanol-water solvent and calculated molar mixing enthalpy of solution

ω	T/K	$x_{cal} \times 10^3$	$x_{exp} \times 10^3$	$\epsilon \times 10^3$	$H_E / J \cdot mol^{-1}$	$H_{cry} / J \cdot mol^{-1}$
0.21	293.2	6.287	6.274	-0.013	420	17705
	298.2	7.498	8.252	0.754	552	17837
	303.2	10.400	10.762	0.362	720	18005
	308.2	14.466	13.927	-0.539	932	18217
	313.2	19.204	17.891	-1.313	1197	18482
0.41	293.2	2.481	2.675	0.194	780	18065
	298.2	3.286	3.403	0.117	992	18277
	303.2	4.315	4.303	-0.012	1254	18539
	308.2	5.610	5.408	-0.202	1577	18862
	313.2	7.088	6.762	-0.326	1971	19256
0.47	293.2	1.673	1.862	0.189	957	18242
	298.2	2.311	2.337	0.026	1201	18486
	303.2	2.968	2.917	-0.051	1499	18784
	308.2	3.754	3.622	-0.132	1861	19146
	313.2	4.647	4.478	-0.169	2300	19585
0.57	293.2	0.605	0.728	0.123	1536	18821
	298.2	0.927	0.883	-0.044	1863	19148
	303.2	1.126	1.067	-0.059	2251	19536
	308.2	1.328	1.285	-0.043	2711	19996
	313.2	1.561	1.544	-0.017	3257	20542
318.2	1.799	1.850	0.051	3903	21188	

由热分析测定的尿苷酸二钠熔点和熔化焓数据求得相应的混合焓。根据式 (3) 可求得结晶焓, 结果列于表 1。

$$\Delta H_{cry} = -\Delta H_{sol} = -(\Delta H_m + \Delta H_E) \quad (3)$$

计算结果表明, 混合焓随体系温度和乙醇质量分数增加而增大, 但与尿苷酸二钠的熔化焓相比较小, 只占结晶焓很小部分。

由表 1 中实验数据回归得到不同体系的 λ 和 h 值以及式 (1) 的计算值与实验值的绝对平均偏差 δ 列于表 2。

表 2 λh 方程参数回归结果及绝对平均偏差

Table 2 Parameters of λh equation and δ

ω	λ	h	R^2	$\delta/\%$
0.21	0.472049	10067.26	0.9911	0.8133
0.41	0.110930	37085.74	0.9941	0.6141
0.47	0.060359	63811.02	0.9940	0.5974
0.57	0.012421	255751.73	0.9864	0.7612

2.3 结晶过程介稳区宽度

针对溶解度和超溶解度的测定受具体实验条件影响显著^[13], 本工作在固定搅拌转速和 pH 值下, 对比了温度和乙醇质量分数对结晶介稳区的影响, 为尿苷酸二钠溶析结晶生产提供了热力学基础数据。

从图 2~图 4 中可以看出, 相同比例乙醇-水混合溶剂中, 尿苷酸二钠超溶解度曲线与溶解度曲线大致平行。温度对超溶解度的影响较弱, 温度越高, 超溶解度越大, 影响程度随乙醇质量分数的增加逐渐减弱。纯水中尿苷酸二钠的介稳区较宽, 随着溶剂中乙醇质量分数的增加介稳区宽度逐渐变窄。这可能是因为溶析剂乙醇与水形成氢键的能力强于尿苷酸二钠, 造成尿苷酸二钠分子间的距离缩短, 增大了分子间相互碰撞成核的概率。

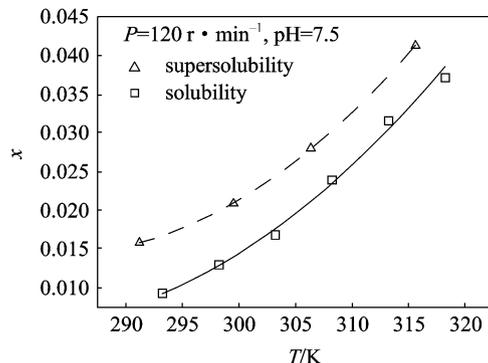


图 2 纯水中尿苷酸二钠的介稳区

Fig. 2 Metastable zone of UMPNa₂ in deionized water

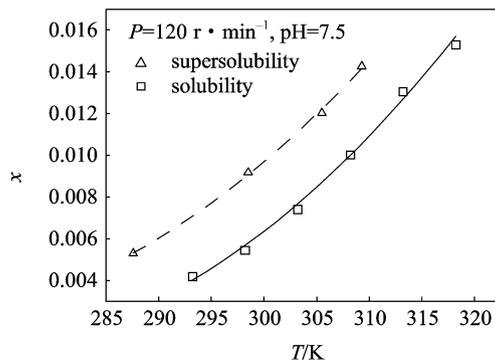


图 3 乙醇-水混合溶剂中尿苷酸二钠介稳区 ($\omega=0.31$)

Fig. 3 Metastable zone in ethanol-aqueous mixture ($\omega=0.31$)

2.4 体系 pH 值对介稳区的影响

结晶过程中, pH 值通常是影响产品纯度和收率的重要因素之一。从分子结构分析, 尿苷酸二钠兼有磷酸基和碱基, 有必要考察体系酸碱度对尿苷

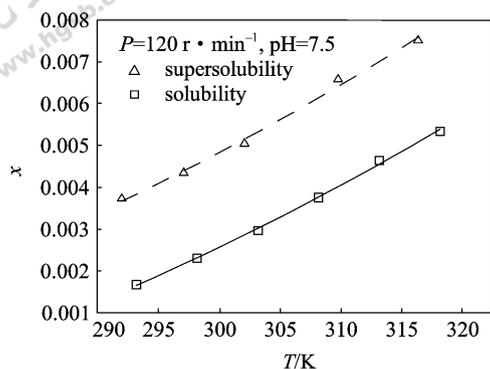
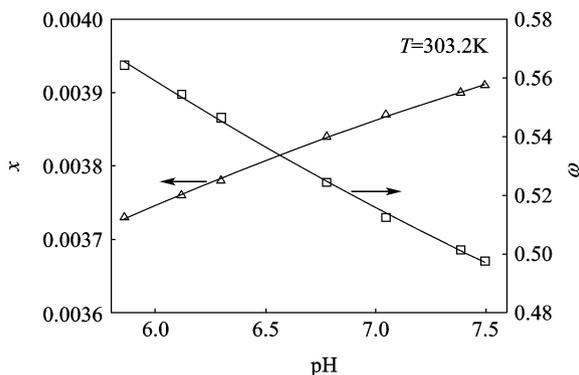
图4 乙醇-水混合溶剂中尿苷酸二钠的介稳区 ($\omega=0.47$)Fig. 4 Metastable zone in ethanol-aqueous mixture ($\omega=0.47$)

图6 pH值对超溶解度的影响

Fig. 6 Effect of pH on supersolubility

酸二钠溶解度和超溶解度的影响。

如图5所示,相同的实验条件下, pH 5.5~8.0之间尿苷酸二钠的溶解度随着 pH 值的增大而减小。不同比例的乙醇-水体系呈现相同的变化趋势,其溶解度曲线大致平行。这可能因为体系 pH 值的升高,抑制了尿苷酸阴离子结合成尿苷酸的平衡,从而引起溶解度呈现小幅降低。

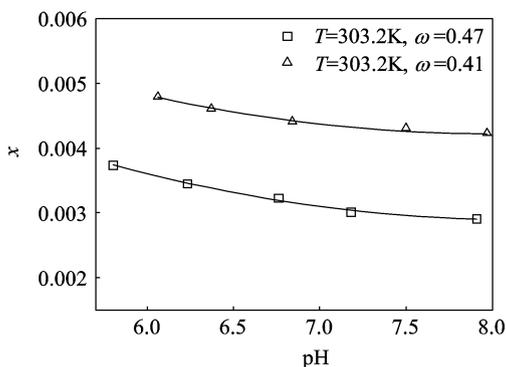


图5 pH值对溶解度的影响

Fig. 5 Effect of pH on solubility

为进一步考察体系 pH 值对结晶介稳区的影响,本文比较了在不同 pH 值下,相同浓度的尿苷酸二钠水溶液体系自发成核时溶剂乙醇的用量,实验结果如图6所示。随着体系 pH 值的升高,初级成核所需乙醇的用量呈线性缓慢减少,相反,超溶解度呈现增大的趋势。综合图5、图6可知,体系 pH 值升高,尿苷酸二钠的溶解度下降,结晶介稳区变宽。因此,调节体系 pH 值可以增大介稳区宽度,缩短结晶时间。

2.5 钠离子浓度对介稳区的影响

酶法水解制备尿苷酸二钠的工艺中,在酶解和离交分离过程,不可避免引入一定浓度的无机盐。

因此,研究尿苷酸二钠-无机盐-水-乙醇体系的热力学行为对结晶过程具有现实的指导意义。本文以氯化钠为研究对象,考察了氯化钠质量分数对尿苷酸二钠-水-乙醇物系热力学的影响。

从图7可以看出,尿苷酸二钠溶解度随溶液中氯化钠质量分数的增大而减小,不同比例的乙醇-水体系呈现相同的变化。随着溶液中氯化钠质量分数的增加,尿苷酸二钠的溶解度呈现先快后慢的下降趋势。这是由于钠离子的存在,导致同离子效应以及与水有更强的亲和力对尿苷酸二钠有盐析作用。因此,少量增加溶液中钠离子浓度对结晶收率是有利的。

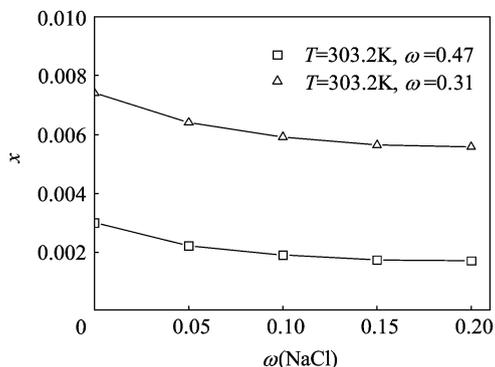


图7 氯化钠质量分数对溶解度的影响

Fig. 7 Effect of $\omega(\text{NaCl})$ on solubility

考察在不同氯化钠质量分数下,相同浓度的尿苷酸二钠水溶液体系自发成核时溶剂乙醇的用量,结果如图8所示。实验结果表明,随着体系中钠离子浓度的升高,初级成核发生时溶剂乙醇的用量呈线性下降,超溶解度呈现增大的趋势,导致尿苷酸二钠的介稳区随着体系钠离子浓度的升高而变宽。

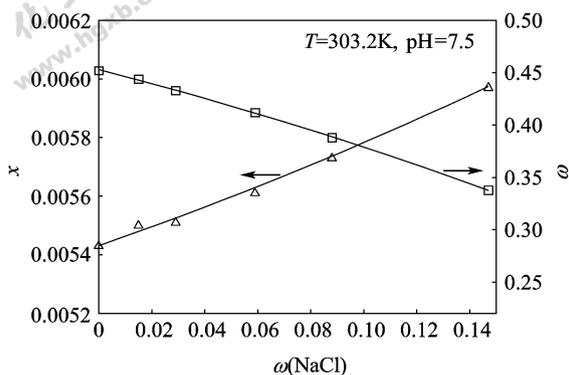


图 8 氯化钠质量分数对超溶解度的影响

Fig. 8 Effect of $\omega(\text{NaCl})$ on supersolubility

2.6 搅拌转速对介稳区的影响

溶析结晶过程中，溶液的有效、均匀混合是晶核形成和生长的前提，因此搅拌强度是影响介稳区的重要因素之一。Melia 等^[14]的研究表明搅拌强度本质上与溶剂体积和结晶器结构密切相关。Barata 等^[15]在 KDP 溶析结晶介稳区研究中指出搅拌强度实际上是能量输入的比较，因此搅拌转速属于流体力学范畴的一个重要影响因素。本文在相同的搅拌桨结构和参数条件下，考察了搅拌转速对尿苷酸二钠介稳区的影响，结果如图 9 所示。在 303.2 K 下，搅拌速率增大，结晶介稳区变窄。

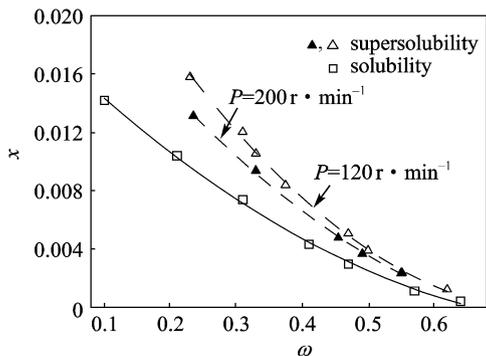


图 9 搅拌转速对超溶解度的影响

Fig. 9 Effect of stir-speed on supersolubility

3 结 论

(1) 采用双光路激光法测定了 293.2~318.2 K 温度范围内，尿苷酸二钠在不同比例乙醇-水混合溶剂中的溶解度和超溶解度。溶解度随乙醇质量分数的增加而减小，随温度的升高而增大，相比之下，溶解度的温度系数较小。实验测定的数据为尿苷酸二钠结晶工艺研究提供了理论依据。

(2) 采用 λh 方程对 4 个体系的溶解度数据进

行关联，并分别求得各体系下的混合焓和结晶焓。结果表明 λh 方程能较好地描述尿苷酸二钠在乙醇-水混合溶剂中溶解度数据。混合焓随体系温度和乙醇质量分数增加而增大，与熔化焓相比较小，在结晶焓中只占很小部分。

(3) 在相同比例的乙醇-水混合体系中尿苷酸二钠超溶解度曲线与溶解度曲线大致平行。与溶解度类似，乙醇质量分数是影响超溶解度的主要因素，超溶解度随乙醇质量分数的增大显著减小，温度对超溶解度的影响较弱。

(4) 在相同的实验条件下，溶液的 pH 值和钠离子浓度升高，以及搅拌转速的降低均增大尿苷酸二钠结晶介稳区宽度。这一结果可应用于结晶过程优化控制，缩短结晶时间，提高结晶收率。

符 号 说 明

- ΔH_{cry} ——结晶焓, $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
- ΔH_{E} ——混合焓, $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
- ΔH_{m} ——熔化焓, $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
- ΔH_{sol} ——溶解焓, $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$
- h —— λh 方程参数, K
- P ——搅拌转速, $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$
- R ——气体常数, $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
- R^2 ——相关指数
- T ——平衡温度, K
- T_{m} ——溶质熔点温度, K
- x ——溶质摩尔分数
- $x_{\text{cal}}, x_{\text{exp}}$ ——分别为溶质摩尔分数理论值、实验值
- ϵ ——相对误差
- λ —— λh 方程参数
- ω ——混合溶剂中乙醇质量分数
- $\omega(\text{NaCl})$ ——氯化钠质量/溶质质量

References

- [1] Gerald P Connolly, John A Duley. Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials. *Review*, 1999, **20**: 218-225
- [2] Fujio T, Maruyama A. Enzymatic production of pyrimidine nucleotides using *Corynebacterium ammoniagenes* cells and recombinant *Escherichia coli* cells; enzymatic production of CDP-choline from orotic acid and choline chloride (I). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1997, **61** (6): 956-959
- [3] Ko J H, Shin H S. Biotransformation of uridine monophosphate (UMP) and glucose to uridine diphosphate-glucose (UDPG) by *Candida saitoana* KCTC7249 cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1996, **60** (1): 41-48

- [4] Ding Xuhuai (丁绪淮), Tan Qiu (谈迺). Industrial Crystallization (工业结晶). Beijing: Chemical Industry Press, 1985
- [5] Hloznv L, Sato A, Kubota No. On-line measurement of supersaturation during batch cooling crystallization of ammonium alum. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 1992, **25** (5): 604-606
- [6] Fevotte G, Klein J P. Application of on-line calorimetry to the advanced control of batch crystallizers. *Chemical Engineering Science*, 1994, **49** (9): 1323-1336
- [7] Zhu Y, Youssef D, Porte C, *et al.* Study of the solubility and the metastable zone of 1, 3-dihydroxyacetone for the drowning-out process. *Journal of Crystal Growth*, 2003, **257**: 370-377
- [8] Li Yang (李阳), Wang Baowei (王保伟), Xu Genhui (许根慧), *et al.* Measurement of crystallizing metastable zone of oxalic acid in aqueous solution with laser scattering method. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2000, **51** (2): 274-277
- [9] Wu Chuan (伍川), Huang Pei (黄培), Shi Jun (时钧). On-line measurement of supersaturation in crystallization. *Journal of Nanjing University of Chemical Technology* (南京化工学院学报), 2001, **23** (3): 23-26
- [10] Wu Chuan (伍川), Huang Pei (黄培), Shi Jun (时钧). Kinetic parameters of KNO_3 in water for batch crystallization process. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China)* (化工学报), 2003, **54** (7): 953-958
- [11] Bao Ying (鲍颖), Wang Jingkang (王静康), Wang Yongli (王永莉), *et al.* The measurement and correlation of solubility of spectinomycin dihydrochloride in pure water and acetone-water mixture. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities* (高校化学工程学报), 2003, **17** (4): 457-461
- [12] Buchowski H, Ksiazczak A, Pietrzyk S. Solvent activity along a saturation line and solubility of hydrogen-bonding solids. *J. Phys. Chem.*, 1980, **84**: 975-979
- [13] Tavare N S. Characterization of crystallization kinetics from batch experiments. *Separation and Purification Methods*, 1993, **22** (2): 193-203
- [14] Melia T P, Moffitt W P. Crystallization from aqueous solution. *J. Colloid Science*, 1964, **19**: 433-447
- [15] Barata P A, Serrano M L. Salting-out precipitation of potassium dihydrogen phosphate (II): Influence of agitation intensity. *Journal of Crystal Growth*, 1996, **163**: 426-433