

四氢嘧啶溶析结晶工艺的研究

李珍爱¹, 李海军^{1,2,3*}, 胡红涛¹, 张英华¹, 郑德强^{1,2,3}, 唐双焱⁴

(1. 山东福瑞达生物科技有限公司, 山东 临沂 276700;

2. 山东福瑞达医药集团有限公司, 山东 济南 250000;

3. 山东省药学科学院, 山东 济南 250000;

4. 中国科学院微生物研究所, 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101)

摘要:为提高四氢嘧啶的结晶收率,提出了有机试剂溶析结晶四氢嘧啶浓缩液方案,考察了溶析剂的选择、料液浓度、溶析剂的添加量及搅拌速率对收率的影响。结果表明,利用6倍料液体积的丙酮从300 g/L的四氢嘧啶浓缩液中溶析结晶出晶体,搅拌速率为300 r/min,一次结晶收率可达94%以上,相比降温结晶提高40%以上,且晶体经重结晶、干燥后纯度可达99%以上。

关键词:四氢嘧啶;有机试剂;丙酮;结晶;干燥

中图分类号:TQ026.5

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2022)11-0207-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2022.11.038

Study on elution crystallization process of tetrahydropyrimidine

LI Zhen-ai¹, LI Hai-jun^{1,2,3*}, HU Hong-tao¹, ZHANG Ying-hua¹,

ZHENG De-qiang^{1,2,3}, TANG Shuang-yan⁴

(1. Shandong Freda Biotechnology Co., Ltd., Linyi 276700, China; 2. Shandong Freda Pharmaceutical

Group Company, Jinan 250000, China; 3. Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250000, China;

4. CAS Key Laboratory of Microbial Physiology and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: A technical solution is proposed for the elution crystallization of tetrahydropyrimidine concentrate by organic reagent to improve the crystallization yield of tetrahydropyrimidine. The influences of the selection of eluent, the concentration of the tetrahydropyrimidine concentrate, the amount of the eluent and the stirring rate on the yield of tetrahydropyrimidine are explored. It is indicated that the primary crystallization yield can reach 94%, 40% higher than that by the cooling crystallization when acetone with a volume 6 times that of the feed liquid is used to elute and crystal the 300 g·L⁻¹ tetrahydropyrimidine concentrate, and the stirring rate is 300 rpm. Moreover, the purity of the crystal after recrystallization and drying can exceed 99%.

Key words: tetrahydropyrimidine; organic reagent; acetone; crystallization; dry

四氢嘧啶又叫1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸,是耐盐微生物为维持渗透压平衡而在细胞内产生的一种相容性溶质。1985年, Galinski等^[1]在Halorhodospira halochoris(原来的盐生绿色外硫红螺菌Ectothiorhodospira halochoris)中首次发现并鉴定。基于其特殊的理化特性,四氢嘧啶在高渗透压、高温、低温、干燥、强酸碱和辐射等逆境条件下对蛋白、核酸、生物膜及细胞都有很好的保护作用^[2-6],可用作生物大分子的稳定保护剂;四氢嘧啶具有高效保湿、修复、抗皱等功效,在化妆品领域具有广阔的应用前景^[7-9];具有光学活性的四氢嘧啶在药理方面有显著的抗炎、抗过敏功效,研究表明,四氢嘧啶对阿尔茨海默式疾病和帕金森氏病有一定的预防效果^[10-13],增加了其在医药行业的应用范围。

溶析结晶是一种常见的分离纯化方法,是利用溶质在不同溶液中的溶解度差或溶解特性来实现结晶的目的。通过滴加溶析剂,使溶质在原溶液中的溶解度减小进而析出固体的过程。溶析结晶工艺具有操作简单、能耗低、生产效率高等优点^[14]。

四氢嘧啶在水溶液中溶解度较高,浓缩后结晶工艺一般采用梯度降温结晶^[15-16],但一次结晶收率较低,结晶后上清液中四氢嘧啶含量较高,占原来浓缩液中的一半。因此,笔者采用有机试剂溶析结晶提高一次结晶率,结晶工艺操作简便、产品纯度高。

1 主要试剂与仪器

丙酮、异丙醇、正丁醇、乙酸乙酯、甲苯、氢氧化钠、无水乙醇,国药集团化学试剂有限公司生产;对

收稿日期:2021-12-01;修回日期:2022-08-29

作者简介:李珍爱(1985-),女,硕士,工程师,研究方向为生物分离纯化,405897970@qq.com;李海军(1978-),男,硕士,研究员,研究方向为生物产品开发,通讯联系人,664508530@qq.com。

照品四氢嘧啶, sigma 公司生产。

磁力加热搅拌器, 天津赛得利斯实验分析仪器制造厂生产; 旋转浓缩蒸发仪 (IKA RV10); 高效液相色谱仪 (Agilent 1260), Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱; 真空干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司生产; 核磁共振波谱仪, 瑞士布鲁克公司生产。

2 实验方法

2.1 溶析剂筛选

经纯化后的四氢嘧啶料液用旋转浓缩蒸发仪浓缩至初始质量浓度为 400 g/L, pH 为 5.0, 采用有机试剂丙酮、异丙醇、正丁醇、乙酸乙酯、甲苯于 4 倍浓缩液体积溶析结晶, 搅拌转速为 300 r/min, 加料速度为 5 mL/min, 对析出的晶体用无水乙醇洗后烘干, 通过高效液相色谱仪检测收率及纯度。

2.2 料液初始质量浓度

经纯化后的四氢嘧啶料液用旋转浓缩蒸发仪浓缩至初始质量浓度分别为 100、200、300、400、500 g/L, 用 4 倍于浓缩液体积的丙酮溶析不同浓度的浓缩液, 搅拌转速为 300 r/min, 加料速度为 5 mL/min, 对析出的晶体用无水乙醇洗后烘干, 通过高效液相色谱仪检测收率及纯度。

2.3 溶析剂用量

经纯化后的四氢嘧啶料液用旋转浓缩蒸发仪浓缩至初始质量浓度为 300 g/L, 将 2 倍、4 倍、6 倍、8 倍、10 倍浓缩液体积的丙酮溶析结晶, 搅拌转速为 300 r/min, 加料速度为 5 mL/min, 对析出的晶体用无水乙醇洗后烘干, 通过高效液相色谱仪检测收率及纯度。

2.4 搅拌速率

经纯化后的四氢嘧啶料液用旋转浓缩蒸发仪浓缩至初始质量浓度为 300 g/L, 将 6 倍浓缩液体积的丙酮溶析结晶, 搅拌转速分别为 100、200、300、400、500 r/min, 加料速度为 5 mL/min, 对析出的晶体用无水乙醇洗后烘干, 通过高效液相色谱仪检测收率及纯度。

2.5 高效液相色谱仪检测

利用高效液相色谱仪配紫外或阵列二极管检测器检测含量及纯度, 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18, 流动相为 5% 乙腈溶液, 检测波长为 210 nm, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35℃。对照品四氢嘧啶配制标准质量浓度为 0.05、0.1、0.25、0.5、0.75 g/L。分别对标准溶液和试样液进行测定, 记录主峰面积,

根据标准溶液浓度及对应的峰面积做标准曲线, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得到标准曲线公式 ($R^2 > 0.99$)。将试样液的峰面积带入公式中即可得到试样中四氢嘧啶的含量。

2.6 结构鉴定

将丙酮溶析出的四氢嘧啶晶体加入纯化水重溶至终质量浓度为 400 g/L, 将溶液中杂质过滤出去, 再用旋蒸仪浓缩结晶, 晶体经无水乙醇处理后干燥。

干燥后样品用核磁共振波谱仪检测, 并与标准品对比核磁共振图谱 ($^1\text{H NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$)^[17], 采用的溶剂为重水 (D_2O)。

3 结果与讨论

3.1 溶析剂对结晶的影响

有机试剂能降低溶液的电解常数, 从而增加溶质分子上不同电荷的引力, 导致溶解度的降低, 进而析出溶质沉淀。基于此理论, 选取了几种四氢嘧啶溶解度很低或几乎不溶的有机试剂如丙酮、甲苯、乙酸乙酯、正丁醇、异丙醇, 从中筛选获得对四氢嘧啶浓缩液溶析效果较好的有机试剂, 结果如表 1 所示。由表 1 中可以看出, 用丙酮对浓缩液溶析结晶, 收率为 94.3%, 相比其他试剂, 收率及纯度都高, 原因是丙酮与其他有机试剂相比, 更能有效增加四氢嘧啶分子间电荷引力, 导致分子聚集, 进而析出晶体。但四氢嘧啶在析出的同时也会带出溶液中部分杂质, 析出晶体纯度为 94%。

表 1 溶析剂种类对结晶的影响

溶析剂种类	收率/%	纯度/%
丙酮	94.2	94.3
甲苯	20.3	89.0
乙酸乙酯	14.8	89.3
正丁醇	19.6	90.3
异丙醇	20.1	95.0

3.2 料液初始质量浓度对结晶的影响

四氢嘧啶在水中溶解度为 50% 左右, 丙酮对较低质量浓度四氢嘧啶溶液的沉淀效果较差, 结果如表 2 所示。由表 2 中可以看出, 初始质量浓度为 200 g/L 时, 收率为 87%; 而质量浓度大于 300 g/L 时, 收率达到 90% 以上, 纯度只与有机试剂种类有关。原因是低质量浓度溶液中溶剂分子浓度大, 需要更多的有机试剂分子来破坏其电解常数, 在丙酮浓度不变的情况下, 只有更高质量浓度的料液析出

的沉淀才更多。另一方面,由于初始质量浓度高,晶体生长所需的过饱和度大,结晶溶液中的悬浮密度较大,有利于晶体的二次成核及生长,最终收率也高。

表 2 料液初始质量浓度对结晶的影响

初始质量浓度/(g·L ⁻¹)	收率/%	纯度/%
100	81.0	93.3
200	87.3	93.4
300	91.6	94.3
400	95.4	94.0
500	95.9	94.7

3.3 溶剂用量对结晶的影响

对于相同质量浓度的料液,添加的溶剂量十分关键,溶剂用量对收率及纯度的影响如表 3 所示。由表 3 中可以看出,6 倍体积的丙酮溶析四氢嘧啶料液,收率为 94%,效果要优于低倍数的丙酮,体积大于 6 倍,四氢嘧啶收率维持在 94%~95% 之间。

表 3 溶剂用量对结晶的影响

用量/倍	收率/%	纯度/%
2	51.6	90.6
4	85.9	92.0
6	94.1	94.1
8	95.0	95.0
10	95.4	94.6

原因是溶剂量大,会大部分取代溶液中原来与溶质分子作用的溶剂分子,使溶液体系的自由能大为提高,导致溶液过饱和而使溶质析出,进而提高结晶率。

3.4 搅拌速率对结晶的影响

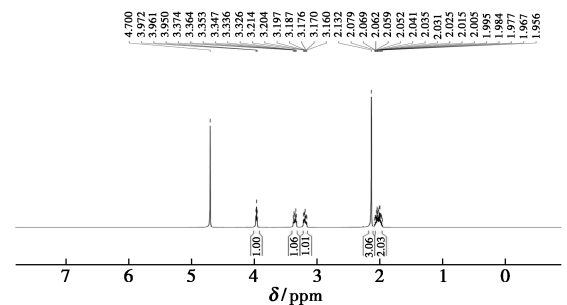
四氢嘧啶在析出的过程中需要在浓缩液中边搅拌边缓慢加入丙酮,及时使丙酮与料液充分接触,搅拌速率对收率及纯度的影响如表 4 所示。由表 4 中可以看出,搅拌速度小于 200 r/min 时,溶液内部出现分层、混合不均匀现象,造成局部饱和度增大和局部初级成核现象,导致收率及纯度较低;而搅拌速度超过 200 r/min 时,会使溶液内部搅动剧烈,使得晶核直接摩擦增加,导致晶核破碎,不利于生长,最终结晶率小、收率低。

表 4 搅拌速率对结晶影响

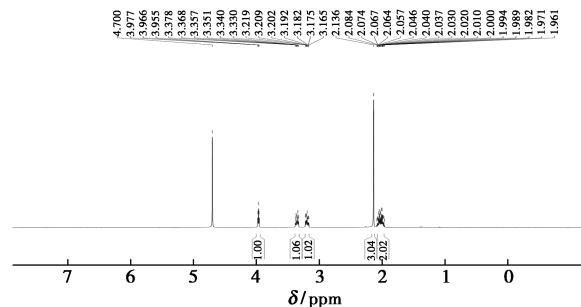
搅拌速率/(r·min ⁻¹)	收率/%	纯度/%
100	86.0	92.5
200	92.0	92.0
300	94.5	94.0
400	95.3	93.6
500	95.2	95.0

3.5 NMR 分析

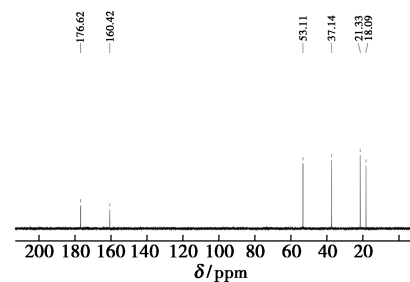
样品的 NMR 图谱如图 1 所示。由图 1 中可以看出,通过与标准品比对,丙酮溶析浓缩液得到的四



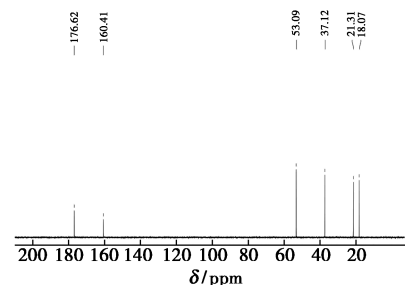
(a) 标样氢谱



(b) 样品氢谱



(c) 标样碳谱



(d) 样品碳谱

图 1 样品的 NMR 图

氢嘧啶 ^1H NMR 氢谱和 ^{13}C NMR 图谱一致,可初步判定丙酮溶析出的晶体为四氢嘧啶。

4 结论

采用有机试剂丙酮对四氢嘧啶浓缩液溶析获得四氢嘧啶晶体,最优料液初始质量浓度为 300 g/L、添加溶析剂丙酮量为 6 倍料液体积、搅拌速率为 300 r/min 时,结晶收率最高可达 94% 以上。湿晶经重溶结晶干燥后,纯度可达 99%。这种结晶方法相比降温结晶收率要提高近 40% 以上,工艺简便、操作简单,更有利于四氢嘧啶的制备。丙酮溶析后上清料液中四氢嘧啶浓度很低,而降温结晶上清料液中四氢嘧啶质量浓度近 300 g/L,且回收工艺繁琐。相比之下,溶析结晶沉淀方法简便有效、成本低、收率高,利于规模化生产。该研究可以为四氢嘧啶的提取纯化提供理论依据及生产指导,但生产中使用的有机试剂量大,需要对生产环境严格管控。

参考文献

- [1] Galinski E A, Pfeiffer H P, Trüper H G. 1, 4, 5, 6-Tetrahydro-2-methyl-4-pyrimidinecarboxylic acid; a novel cyclic amino-acid from halophilic phototrophic bacteria of the genus *Ectothiorhodospira* [J]. *Eur J Biochem*, 1985, 149: 135-139.
- [2] Pastor J M, Salvador M, Argandona M, et al. Ectoinines in cell stress protection: Uses and biotechnological production [J]. *Biotechnol Adv*, 2010, 28: 782-801.
- [3] Nagata S, Wang Y B. Accumulation of ectoine in the halotolerant *Brevibacterium* sp. JCM6894 [J]. *J Biosci Bioeng*, 2001, 91: 288-293.
- [4] Lippert K, Galinski E A. Enzyme stabilization by ectoinetype compatible solutes: protection against heating, freezing and drying [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, 37: 61-65.
- [5] 李强,王越,王运吉,等. Ectoine 对 Cu-Zn 型 SOD 酶热稳定性的影响. *大连轻工业学院学报*, 2007, 26(2): 116-119.
- [6] 郑昕,张玲华. Ectoine 提高啤酒麦芽中酶的热稳定性的研究 [J]. *酿酒科技*, 2009, (9): 36-38.
- [7] Bünger J. Ectoine added protection and care for the skin [J]. *Euro-cosmetics*, 1999, 7: 22-24.
- [8] Bünger J, Degwert J, Driller H. The protective function of compatible solute ectoin on the skin cells and its biomolecules with respect to UV-radiation, immunosuppression and membrane damage [J]. *IFSCC Magazine*, 2001, 4: 1-6.
- [9] Antonio V, Joaquin J, Nieto A O. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(2): 504-544.
- [10] Arora A, Ha C, Park C B. Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules [J]. *FEBS Letters*, 2004, 564(2): 121-125.
- [11] Kanapathipillai M, Lentzen G, Sierks M, et al. Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid [J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(21): 4775-4780.
- [12] Furusho K, Yoshizawa T, Shoji S. Ectoine alters subcellular localization of inclusions and reduces apoptotic cell death induced by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch [J]. *Neurobiology of Disease*, 2005, 20(1): 170-178.
- [13] Schnoor M, Voss P, Cullen P, et al. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer [J]. *Biochemical and Biophysics Research Communications*, 2004, 322: 867-872.
- [14] 王坤坤,段二红. L-脯氨酸结晶过程研究 [D]. 石家庄: 河北科技大学, 2015.
- [15] 山东福田药业有限公司. 一种从嗜盐微生物发酵液中分离提取四氢嘧啶的方法: 中国, 109053587A [P]. 2018-12-21.
- [16] 朱道辰. 四氢嘧啶及羟基四氢嘧啶的膜技术提取方法: 中国, 102226210A [P]. 2011-10-26.
- [17] Shinichi Nagata, Yaoqiang, Akinobu Oshima, et al. Efficient cyclic system to yield ectoine using *Brevibacterium* sp. JCM 6894 subjected to osmotic downshock [J]. *Bio-technology and Bioengineering*, 2008, 99(4): 941-948. ■
- [18] Chen H, Wang J L. Catalytic ozonation of sulfamethoxazole over $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Co}_3\text{O}_4$ composites [J]. *Chemosphere*, 2019, 234: 14-24.
- [19] Lei Z, Ma J, Sun Z Z, et al. Catalytic ozonation for the degradation of nitrobenzene in aqueous solution by ceramic honeycomb-supported manganese [J]. *Applied Catalysis B Environmental*, 2008, 83(3-4): 256-264.
- [20] Afzal S, Quan X, Zhang J. High surface area mesoporous nanocast LaMO_3 (M = Mn, Fe) perovskites for efficient catalytic ozonation and an insight into probable catalytic mechanism [J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2017, 206: 692-703.
- [21] Shiraga M, Kawabata T, Li D, et al. Memory effect-enhanced catalytic ozonation of aqueous phenol and oxalic acid over supported Cu catalysts derived from hydrotalcite [J]. *Applied Clay Science*, 2006, 33(3/4): 247-259.
- [22] Yan P W, Shen J M, Zhou Y C, et al. Interface mechanism of catalytic ozonation in an $\alpha\text{-Fe}_{0.9}\text{Mn}_{0.1}\text{OOH}$ aqueous suspension for the removal of iohexol [J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2020, 277: 119055.
- [23] Shen Z Y, Zhou H Y, Pan Z C, et al. Degradation of atrazine by Bi_2MoO_6 activated peroxymonosulfate under visible light irradiation [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 400: 123187.
- [24] 赵星鹏,王姬乔,高生旺,等. $\text{BiOBr}/\text{CeO}_2$ 复合材料的制备及光催化降解磺胺异噻唑 [J]. *应用化学*, 38(4): 422-430. ■

(上接第 206 页)