

沉淀法分离硫酸粘杆菌素工艺研究

丁绪芹¹, 张劲松², 王福岭²

(1. 明治医药(山东)有限公司, 山东济宁 272100; 2. 山东胜利生物工程有限公司, 山东济宁 272100)

[收稿日期] 2013-03-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2013)06-0027-04 [中图分类号] S859.796

[摘要] 研究了碱性沉淀分离法提取发酵液中多粘菌素 E 的生产工艺。通过对沉淀结晶过程 pH、温度、结晶速率、晶种量及加入时间、保护剂浓度等工艺参数对结晶效果的影响进行考察, 在最佳结晶条件为 pH 11.5 ~ 12.0、15 ~ 20 °C、静置 0.5 ~ 1 h 时, 最高收率达到 95% 以上, 脱色后干粉各项指标达到 CP 和 EP 标准, 进一步通过中试试验对各个参数进行检验以及校正, 得到了一种适用于工业化生产的硫酸粘杆菌素 E 分离工艺。该方法与目前生产中广泛应用的树脂提取法相比, 成品质量及收率明显提高, 同时减少了污水排放, 环保效益明显。

[关键词] 硫酸粘杆菌素; 沉淀分离法; 碱性多肽

Technology Research of Separating Colistin Sulfate by Precipitation

DING Xu-qin¹, ZHANG Jin-song², WANG Fu-ling²

(1. Meiji Pharmaceutical (Shandong) Co., Ltd, Jining, Shandong 272100, China;

2. Shandong Shengli Bioengineering Co., Ltd, Jining, Shandong 272100, China)

Abstract: The production process of extracting colistin sulfate E from fermentation liquid by alkaline precipitation separation method was studied. pH value, temperature, crystallization rate, quantity of crystal seed and adding time, protective agent concentration of process parameters during precipitation and crystallization on the effects of crystallization were investigated. Stationary for 0.5 ~ 1 hour at the best crystallization conditions of pH 11.5 ~ 12.0 and 15 ~ 20 °C, the highest yield reached above 95%, bleaching powder after each index to CP and EP standard. After decolorization, indexes of the dry powder can reach CP and EP standard. Further inspection and calibration were conducted by pilot test. A kind of colistin sulfate E separation technology complied with industrialization production was obtained. Compared with the resin extraction method which was widely applied currently, there was obvious enhancement of quality and yield. Meanwhile, sewage were decreased and the environment effect was obvious.

Key words: colistin sulfate; precipitation separation method; alkaline polypeptide

多粘菌素 E 是一种碱性多肽类抗生素, 兽用硫酸粘杆菌素商品为其硫酸盐。目前生产中主要通过树脂法分离提取^[1-2], 但此法带来大量的污水, 严重污染环境。文献报道关于多粘菌素 E 分离技

术较多, 如膜分离法、溶媒萃取法、吸附法^[3]、泡沫分离法^[4], 但都处于试验阶段, 尚未形成成熟工艺, 无法应用于工业化生产。沉淀法分离抗生素是一种传统方法, 操作简单, 但由于多粘菌素在较强酸

碱溶液中的不稳定性,目前尚无利用此法的生产报道。本文通过对沉淀法分离多粘菌素 E 进行研究,优化各项工艺操作参数,以期得到一种适用于工业化生产的分离工艺。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器 多粘菌素 E 标品由上海江莱生物科技有限公司提供,硫酸及硫酸盐 (AR) 由济南市恒德锐化工有限公司生产。

高压液相色谱 (LC-3000, 山东金普分析仪器有限公司), 陶瓷膜超滤设备 (合肥世杰膜工程有限责任公司), 恒温水浴锅 (DHKW, 北京中兴伟业仪器有限公司), 真空泵 (SHZ-C 全不锈钢, 上海互佳仪器设备有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 发酵液预处理 2% 硫酸调节发酵液 pH 4.8 左右, 酸化 0.5~1 h 后, 陶瓷膜超滤。

1.2.2 多粘菌素 E 测定 采用高效液相色谱法 (HPLC), 参照文献^[5-6] 提供方法。

1.2.3 结晶及浓缩液制备方法 取一定体积超滤液, 浓碱缓慢均匀搅拌加入, pH 调至 12.3~12.5, 静置 0.5 h 后过滤抽干即得湿晶体, 湿晶体用 1 mol/L 酸溶解后, 去离子水定容至 1/10 体积。

1.2.4 计算方法 总亿 = 效价 × 体积 / 10⁹; 收率 (%) = 浓缩液总亿 / 超滤液总亿 × 100%; 母液残留率 (%) = 母液残留总亿 / 超滤液总亿 × 100%; 降解率 (%) = 100% - (收率 + 母液残留率)。

2 结果与分析

2.1 温度对多粘菌素 E 稳定性及结晶收率影响 在不同的水浴温度中静置结晶 (图 1), 20℃ 左右收率 达到最高, 此时母液残留率及降解率 达到最低点。结果表明: 过低温度不利于多粘菌素结晶, 可能与其沉淀是非晶体絮凝物有关, 相对较高的温度有利于絮凝沉淀快速形成, 从而减少母液中游离肽的降解量。

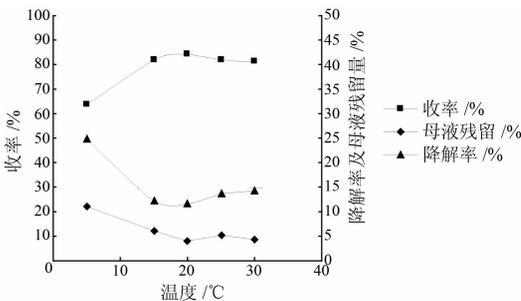


图 1 结晶温度对多粘菌素 E 沉淀效果的影响

不同温度条件下, 延长母液及湿晶体在碱性条件下的处理时间, 分别测定温度对母液中游离肽和沉淀结晶的影响。

不同温度条件下母液处理结果如图 2 所示, 碱性条件下温度对游离肽的稳定性影响较大, 6 h 时 5℃ 降解率 3% 左右, 15℃ 降解率升至 13% 以上, 25℃ 以上时降解率达到 40%。结果表明: 较高温度条件下游离肽的稳定性差, 同时降解率随处理时间的延长明显升高。

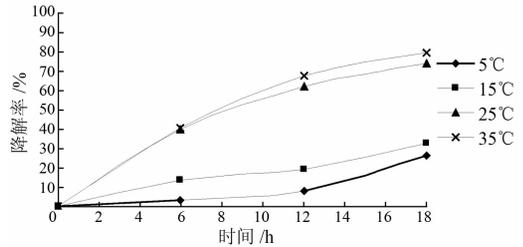


图 2 碱性条件下温度对游离肽降解率的影响

温度对湿晶体稳定性的影响如图 3 所示, 低温条件下湿晶体的稳定性相对较高, 同时随着时间延长, 降解率的累积明显升高, 6 h 时 5℃ 条件下, 降解率接近 2%。

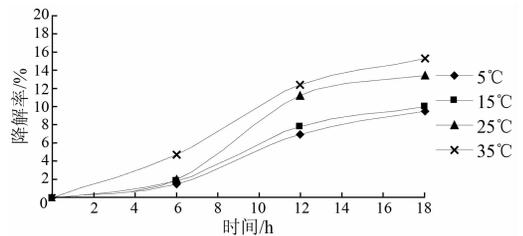


图 3 碱性条件下温度对湿晶体稳定性的影响

结果表明: 碱性条件下, 游离肽的稳定性较差, 易发生降解或与低糖及氨基酸产生美拉德反应^[7-8], 而沉淀状态结晶稳定性高。低温不利于沉淀结晶快速形成, 导致降解量升高, 而过高的温度直接加速降解反应速率, 也不利于结晶收率。因此, 最佳的结晶温度在 20℃ 左右, 既有利于结晶快速大量形成, 同时降解率相对偏低, 有利于得到最高的结晶收率。

2.2 pH 对多粘菌素 E 稳定性及结晶收率影响 试验中发现, 在 pH 接近 9.0 时, 开始出现大量絮状沉淀结晶, 因此考察了晶体出现前的 pH 对多粘菌素 E 最终收率的影响 (图 4)。pH 调至试验设定值

时静置 0.5 h 后, 调至 12.3 ~ 12.5 结晶。

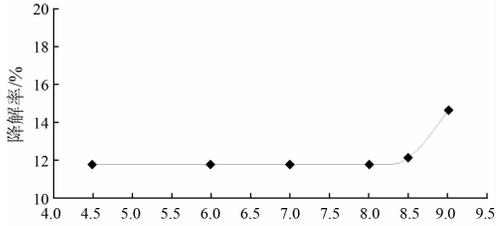


图4 结晶过程中间 pH 对结果的影响

结果可见, pH > 8.5 时, 游离态多粘菌素的稳定性开始快速下降, 容易发生降解反应; 同时说明游离肽在碱性条件下的存在时间对收率有重要影响, 即较短的结晶时间, 沉淀加速析出, 降低了游离肽的降解时间及降解量。

结晶 pH 对结晶效果的影响如图 5 所示, 结果可见: pH 在 11.5 ~ 12.0 之间, 结晶收率为 88% 左右, 达到最高。pH 过低, 母液中残留效价较高, 导致降解率较高; 反之 pH 过高, 直接导致降解速率加快, 收率降低。结果表明: pH 11.5 ~ 12.0 时, 收率较高, 且降解率相对较低。

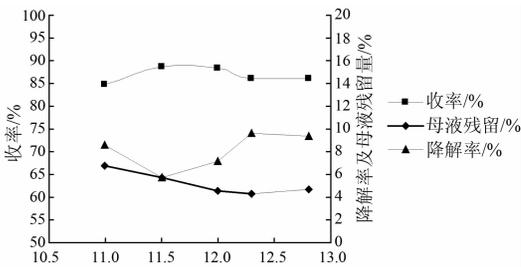


图5 结晶 pH 对多粘菌素 E 结晶效果的影响

2.3 结晶时间对多粘菌素 E 稳定性及结晶收率影响 多粘菌素 E 在碱性条件下稳定性较差, 结晶时间对其降解量及收率影响可能较大。结晶后静置时间对结晶效果的影响(图 6): 0.5h 时母液残留

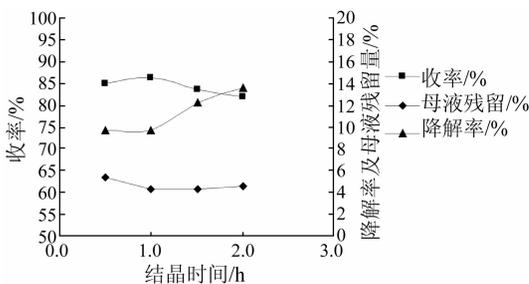


图6 结晶静置时间对结晶效果的影响

最高, 降解率最低; 1 h 左右收率达到最高, 之后收率下降, 母液残留率基本稳定在 4% ~ 4.5%, 降解率快速升高。结果表明: 结晶后静置 1 h 左右有利于完全沉淀, 时间过长, 则降解率过高, 不利于收率提高。

进一步考察结晶过程 pH 调节速率对结晶效果的影响(图 7): 结果可见, 随着加碱时间延长, 收率逐步降低, 降解率升高, 与上步试验相印证。结果表明: 缩短 pH 调节时间快速结晶, 有利于结晶快速出现, 减少降解时间, 提高收率。

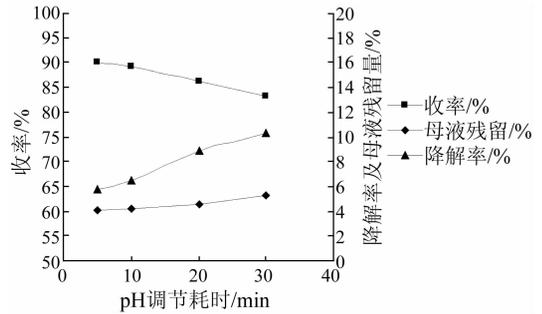


图7 pH 调节速率对结晶效果的影响

2.4 晶种对多粘菌素 E 稳定性及结晶收率影响 pH 调至 9.5 左右时, 结晶开始明显出现, 此时加入不同量晶种(图 8)。

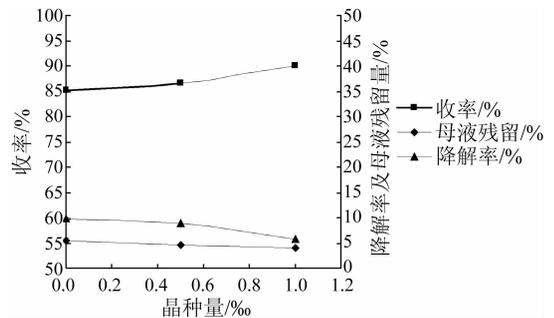


图8 外加晶种量对结晶效果的影响

结果可见, 添加 1% 量晶种, 收率达到 90%, 加晶种组收率明显高于对照组, 同时降解率及母液残留率也较低, 说明加入晶种增加晶核量, 对沉淀结晶的出现及生长有促进作用。

0.5% 晶种加入时 pH 对结晶效果的影响(图 9): pH 9.5 时加入晶种, 收率接近 90%, 明显高于其他组。pH 9.8 时, 自然晶核已经大量形成, 外加晶核作用减弱, 晶核量加入过少, 差异性不显著; pH 9.2 时, 晶核加入过早对收率影响不大。

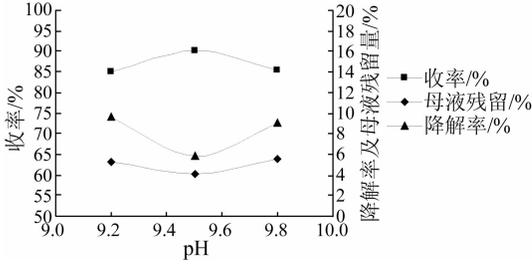


图9 0.5%晶种加入 pH 对结晶效果的影响

结果表明:pH 9.5 时,外加 0.5%~1%晶种对结晶有明显促进作用。

2.5 保护剂对多粘菌素 E 稳定性及结晶收率影响

试验初期发现还原性保护剂对多粘菌素 E 在高温条件下的稳定性有一定帮助作用,结晶过程保护剂对结晶效果的影响如图 10 所示。

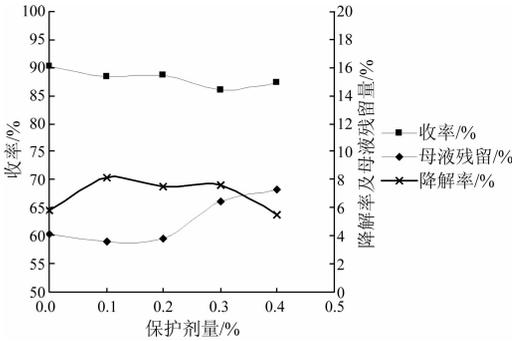


图10 不同保护剂比例对结晶效果的影响

结果可见,母液中残留效价随助剂加入量增多而提高,降解率升高,导致收率降低。结果表明:保护剂对多粘菌素 E 可能有一定盐溶影响,增加其游离态溶解度,导致不易沉淀,降解率升高,总体上保护剂对收率未发挥积极作用。

2.6 过滤温度对多粘菌素 E 稳定性及结晶收率影响

过滤时间在 2~3 h,且结晶液和晶体处于碱性条件,试验中环境及设备温度对多粘菌素的稳定性都可能造成影响,过滤温度对母液及晶体的稳定性如图 11 所示。

结果可见:5℃时收率最高达到 96% 以上,母液残留几乎为 0,降解率小于 3%,温度升高各项指标都对收率不利。结果表明:结晶液在过滤前降低

温度至 10℃ 以下,有利于稳定性以及收率提高。

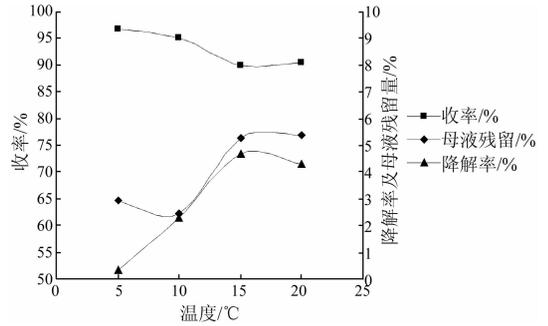


图11 过滤温度对结晶效果的影响

3 结论

本研究结果表明,最佳结晶条件:pH 11.5~12.0,结晶温度 15~20℃,结晶后静置 0.5~1 h,最高收率达到 95% 以上,脱色后喷雾干燥,成品各项指标达到 CP 和 EP 标准。目前尚未解决的问题主要有浓缩液色素量不稳定对结晶及脱色过程的影响、脱色及成品质量稳定性等,有待进一步研究和探索。

参考文献:

- [1] 顾觉奋,寇晓康,杜振宁,等. 离子交换与树脂吸附在制药工业上的应用[M]. 北京:中国医药科技出版社,2008:3.
- [2] 佟 斌,刘桂敏,吴兆亮,等. 泡沫分离提取多粘菌素 E 的工艺研究[J]. 食品工业科技,2007,28(5):153-155.
- [3] 邢维玲,周希贵,王贺祥,等. 离子交换层析法提取黏杆菌素的研究[J]. 中国兽医杂志,2002,11:44-46.
- [4] 孟 杰,刘桂敏,赵艳丽,等. 硫酸多黏菌素 E 水溶液的表面张力和泡沫性能的研究[J]. 中国抗生素杂志,2007,32(11):696-672.
- [5] 解庆镇,顾吉林. 硫酸粘杆菌素 E 的高效液相色谱测定[J]. 抗生素,1988,1(13):36-40.
- [6] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(第二部)[M]. 北京:化学工业出版社,2000.
- [7] 李 林,卢家炯. 美拉德反应的抑制及消除方法[J]. 广西轻工业,2000,4:16-18.
- [8] 吴惠玲,王志强,韩 春,等. 影响美拉德反应的几种因素研究[J]. 现代食品科技,2010,26(5):440-443.

(责任编辑:侯向辉)