D152 树脂对多粘菌素 E 的提取性能研究

赵振中，李海超

（河北圣雪大成唐山制药有限责任公司，河北 唐山 064000）

摘要：多粘菌素 E 由多粘类芽孢杆菌发酵产生，主要采用离子交换法进行提纯。研究了 D152 阳离子交换树脂提取多粘菌素 E 的各项指标，并将 D152 树脂与现有工艺设备进行匹配，得到了提取过程中吸附量、洗脱速率、收率等指标。多粘菌素 E 过滤液 pH 为 6.0～7.0，色谱效价 30 万 U/mL，采用 3 柱串联吸附工艺，在吸附流速 1.0 BV/h、硫酸洗脱流速 1.0～1.5 BV/h 条件下，D152 树脂吸附量可达 680 万 U/mL（湿树脂），总收率≥98.0%。连续运行 6 个月，D152 树脂性能稳定。

关键词：多粘菌素 E；D152 树脂；离子交换

中图分类号：S476 **文献标志码**：A **文章编号**：1000-8063(2023)03-0063-06

DOI：10.13426/j.cnki.yky.2023.03.10

多粘菌素 E 为白色或类白色粉末，味苦、无臭，易溶于水、苯甲醇，微溶于甲醇，不溶于丙酮和乙醚等，其游离碱微溶于水，目前市售产品为其硫酸盐。多粘菌素 E 由多粘芽孢杆菌发酵产生，是 1 种多肽类抗生素，包含多种氨基酸和脂肪酸；其硫酸盐为硫酸多粘菌素 E，有较好的热稳定性，在 pH 3.0～7.5 内较稳定。作为抗生素，多粘菌素 E 与细胞膜结构中的游离氨基酸和细胞膜中游离的磷酸根发生作用，增加细胞膜通透性，从而杀死细菌[1-2]。

多粘菌素 E 的提取方法主要有溶剂萃取法[3]、泡沫分离法[4]、活性炭吸附法、沉淀法[5-7]、离子交换法[8-10]等，其中离子交换法因易获得纯度较高的产品、成本低而得到广泛应用。目前制药企业对多粘菌素 E 的提取工艺主要是：发酵液过滤—树脂吸附—硫酸洗脱—洗脱液后处理。目前用离子交换法提取多粘菌素 E 的研究主要是利用溶解多粘菌素 E 成品得到的溶液进行条件优化选择。但在实际生产中，发酵过滤液的组分复杂，不仅存在大量的残糖、蛋白质、色素等有机分子，也存在大量的 Ca^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{3+} 等无机离子，这些物质均会对吸附过程造成影响，导致收率损失和产能降低。D152 树脂为强碱弱酸型阳离子交换树脂，对抗生素具有良好的吸附作用[11]。研究 D152 树脂吸附多粘菌素 E 的特性，旨在优化多粘菌素 E 的生产工艺，提高产品质量，为发挥现有生产装备最大产能提供生产控制参数。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

仪器：Waters e2695-2489 高效液相色谱仪，pHS-3C 型精密酸度计，电子天平（美加宁 MJN-681），机械搅拌器，陶瓷膜（上海奥赛分离技术工程有限公司），水环真空泵，自制离子交换柱。

主要试剂：HCl、$H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$、H_2SO_4、NaOH、EDTA－2Na、氨水、NH_4Cl、Na_2SO_4 等，均为分析纯；试验用水为自制无盐水；D152 树脂（核工业北京化工冶金研究院）：湿视密度0.8 g/mL，粒度（0.27～1.0 mm）90%，水分 70.4%。

试验样品：多粘菌素 E 发酵液（河北圣雪大成唐山制药有限责任公司）。

1.2 树脂预处理

将 D152 树脂交替用 4.0%盐酸和 3.0%氢氧化钠溶液浸泡再生 3 次，每次浸泡后用无盐水洗树脂至 pH≥3.0（盐酸浸泡时）或 pH≤11.60

收稿日期：2023-03-27

第一作者简介：赵振中（1982—），男，河北保定人，学士，工程师，主要研究方向为微生物制药提取。

通信作者简介：李海超（1989—），男，河北唐山人，学士，工程师，主要研究方向为微生物制药提取。

(氢氧化钠溶液浸泡时),备用。

1.3 试验方法

1.3.1 发酵液预处理

取发酵液,按照草酸质量与发酵液体积比5∶1 g/L,加入 $H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$,搅拌 30 min 后经陶瓷膜过滤处理,收集过滤液。按照试验要求稀释和调整 pH。

1.3.2 过滤液 pH 对吸附系统的影响

在 25 ℃下,取 200 mL 过滤液,用 1 mol/L 的 NaOH 调节溶液 pH 为 4.0～8.0,控制机械搅拌器转速为 1 000 r/min,每 1 h 采用 HPLC 法检测效价,研究 pH 对多粘菌素 E 过滤液效价的影响。

根据现有生产参数,将处理好的 D152 树脂采用单柱湿法装柱,控制径高比为 2∶5;料液温度为 25 ℃。用 3.0% NaOH 溶液将过滤液 pH 调整至 4.5、5.0、6.0、7.0、8.0,然后在吸附流速1.0 BV/h 条件下进行吸附,待出口浓度与进口浓度相等时,吸附结束,计算每 mL 湿树脂的吸附量。

1.3.3 过滤液效价对 D152 树脂吸附量的影响

根据现有生产工艺设备进行动态吸附试验。单柱湿法装柱,树脂装量径高比为 2∶5,试验温度为 25 ℃,吸附流速 1.0 BV/h,过滤液 pH 6.0～7.0。分别将过滤液效价稀释至 25、30、35、40 万 U/mL 进行动态吸附,待出口浓度与进口浓度相等时,终止试验,绘制吸附量曲线。

1.3.4 吸附流速优化

吸附流速和吸附量的平衡点影响产能的高低。因此,对吸附流速进行研究,选择更适合 D152 树脂的吸附流速。选择单柱湿法装柱,树脂装量径高比为2∶5,试验温度为 25 ℃,过滤液效价为 32 万 U/mL、硬度为 400 μg/mL、pH 6.0～7.0,控制吸附流速为 1.0、2.0 BV/h,待出口效价与进口效价相等时,终止试验。绘制穿透曲线和吸附曲线。

1.3.5 洗脱剂浓度优化

以稀硫酸作为洗脱剂,按照 1.0 BV/h 流速进行洗脱。在 25 ℃条件下,研究洗脱剂浓度对 D152 树脂洗脱效果影响。选择在过滤液效价 30 万 U/mL、pH 7.0、吸附流速 1.0 BV/h 条件下动态吸附饱和且清洗完毕的 D152 树脂柱,进行洗脱试验,洗脱液浓度分别为 0.2、0.3、0.4、0.5 mol/mL,绘制洗脱曲线。

1.3.6 洗脱剂流速优化

取吸附饱和且清洗完毕的 D152 树脂进行装柱,选取 1.3.6 得到的最佳洗脱剂浓度,以不同的洗脱流速(0.5、1.0、1.5 BV/h)进行洗脱试验,绘制洗脱曲线。

1.3.7 生产工况性能评价

根据上述优化条件调整生产工艺参数,从产能、物料质量、收率、树脂运行情况等方面进行综合评价。生产采用 3 柱串联吸附工艺,依过滤液流向分别作为主、副、次交换柱,吸附方式采用自下而上的反进吸附方式,切换周期 8 h。

1.4 检测方法

使用高效液相色谱法对多粘菌素 E 的效价进行检测,具体测定方法参考 2020 版兽药典[12]。按照《水质 钙和镁总量的测定 EDTA 滴定法》(GB/T 7477—1987)检测溶液总硬度[13]。

1.5 计算公式

$$吸附收率=(c_1V_1-c_2V_2)/c_1V_1\times100\%,$$

$$洗脱收率=c_3V_3/(c_1V_1-c_2V_2)\times100\%,$$

$$总收率=吸附收率\times洗脱收率,$$

式中:c_1—过滤液效价,U/mL;c_2—吸附废水效价,U/mL;c_3—洗脱液效价,U/mL;V_1—过滤液体积,mL;V_2—吸附废水体积,mL;V_3—洗脱液体积,mL。

2 试验结果与讨论

2.1 过滤液 pH 对吸附系统的影响

多粘菌素 E 在不同 pH 条件下,效价随时间变化情况见图 1。多粘菌素过滤液效价在 pH 6.0～7.0 范围内稳定性较好,在碱性条件下降解严重,这与文献[14-16]表述一致。

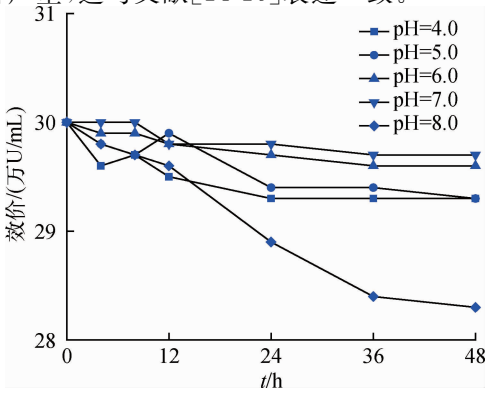


图 1 过滤液 pH 对多粘菌素 E 稳定性的影响

Fig. 1 Effect of filtrate pH on the stability of polymyxin E

D152 树脂在不同 pH 条件下的吸附量见图 2。可以看出，D152 树脂的吸附量随着过滤液 pH 的升高而明显增加。这是由于 D152 树脂上的—COONa为弱酸性基团，其电离程度受溶液 pH 影响很大，尤其是在强酸性条件下很难发生离子交换反应，所以 D152 树脂的吸附量随溶液 pH 下降而减小，随 pH 升高而增加。在实际应用中考虑到多粘菌素 E 的稳定性，将过滤液 pH 控制在 6.0～7.0 内进行吸附。

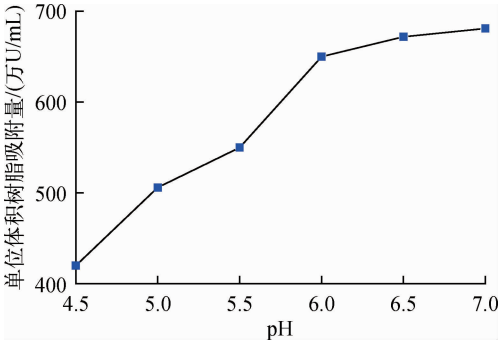


图 2　过滤液 pH 对 D152 树脂吸附量的影响

Fig. 2　Effect of filtrate pH on adsorption capacity of D152 resin

2.2　过滤液效价对吸附量的影响

过滤液效价是影响产能和 D152 树脂吸附量的重要因素之一。模拟了动态吸附条件下，过滤液效价对 D152 树脂吸附量的影响，结果见图 3～图 4。可以看出，过滤液效价在 25～40 万 U/mL，D152 树脂吸附量呈缓慢递增趋势；效价大于 30 万 U/mL 以后，D152 树脂吸附速率基本不增加。

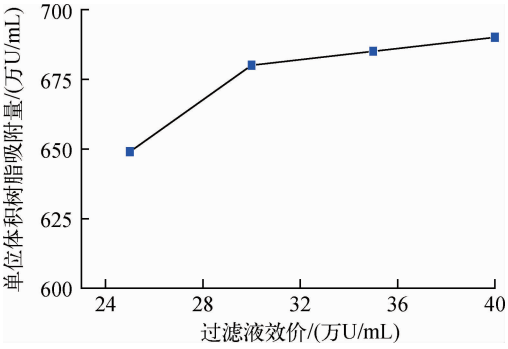


图 3　过滤液效价对 D152 树脂吸附量的影响

Fig. 3　Effect of filtrate titer on adsorption capacity of D152 resin

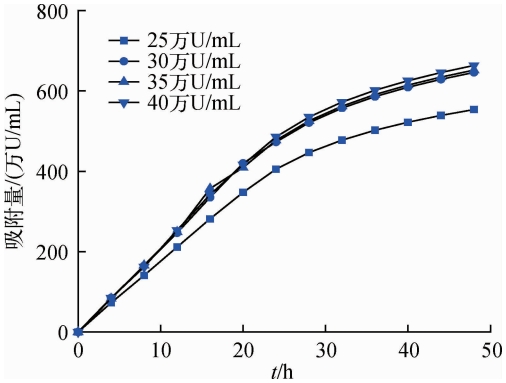


图 4　D152 树脂吸附曲线

Fig. 4　D152 resin adsorption curve

分析其原因，认为是由于在过滤液效价较低时，离子交换速率主要是由外扩散控制，此时浓度增加，交换速率也会增加；但随着效价增加，交换速率受内扩散和外扩散同时作用，此时交换速率增加缓慢；继续增加过滤液效价，离子交换过程主要受内扩散控制，交换速率到达极限，此时会造成收率损失。所以实际生产过程中，为了同时保证吸附收率和产能，过滤液效价应尽可能控制在 30 万 U/mL 左右。

2.3　过滤液流速对吸附量的影响

过滤液流速对 D152 树脂吸附量的影响见图 5～图 6。

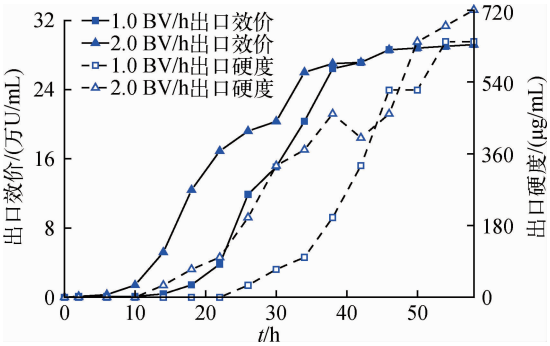


图 5　不同流速下 D152 树脂的穿透曲线

Fig. 5　Penetration curves of D152 resin at different flow rates

从图 5 可看出，在 1.0 BV/h 流速下吸附 8 h，出口溶液的效价为 900 U/mL，而 2.0 BV/h 流速吸附 8 h 出口效价为 5 000 U/mL 左右，说明过滤液效价增加至 30 万 U/mL，D152 树脂性能完

全满足生产要求(1.0 BV/h)。在常温稀溶液中,离子的化合价越高,越易被交换[17]。多粘菌素 E 在溶液状态下呈+5 价,所以随着吸附过程的进行,多粘菌素 E 会置换已经被吸附的 Ca^{2+}、Mg^{2+},因此出口溶液的硬度会增加(图 6)。但随着多粘菌素 E 吸附量的增加,出口溶液的效价不可控,造成收率损失。虽然较低流速能够增加吸附量,但会降低生产效率,所以选择1.0 BV/h流速作为吸附上柱流速。

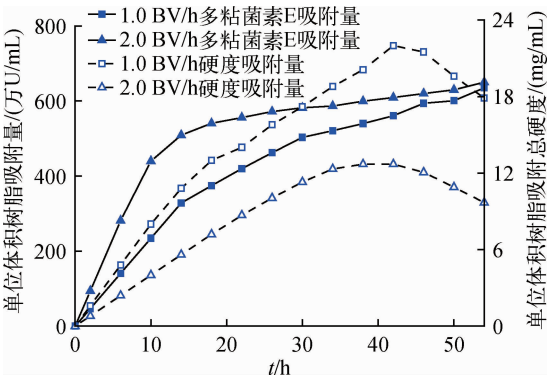


图 6 过滤液流速对 D152 树脂吸附量的影响

Fig. 6 Effect of filtrate flow rate on adsorption capacity of D152 resin

2.4 洗脱剂浓度选择

洗脱剂浓度对洗脱液出口效价的影响见图 7～图 8。

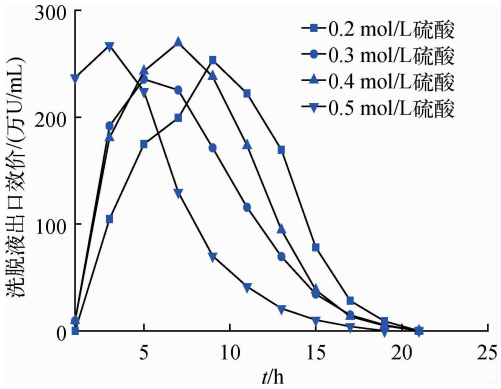


图 7 不同浓度硫酸的洗脱曲线

Fig. 7 Elution curves of sulfuric acid at different concentrations

从图 7～图 8 可看出,0.2 mol/L 硫酸的洗脱曲线出现明显的拖尾现象,洗脱时间较长,影响进度与产能;而 0.5 mol/L 硫酸的洗脱曲线,高效价集中,但 pH 下降较快,过低的 pH 会增加后续的中和难度,增加处理成本。所以洗脱剂以0.3～0.4 mol/L硫酸为宜。

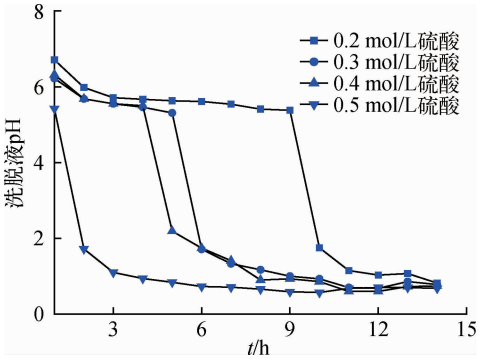


图 8 洗脱剂浓度对洗脱液 pH 的影响

Fig. 8 Effect of eluent concentration on eluate pH

2.5 洗脱剂流速优化

选择动态吸附试验考察洗脱剂流速对 D152 树脂吸附多粘菌素 E 的影响。不同流速下的洗脱曲线见图 9。

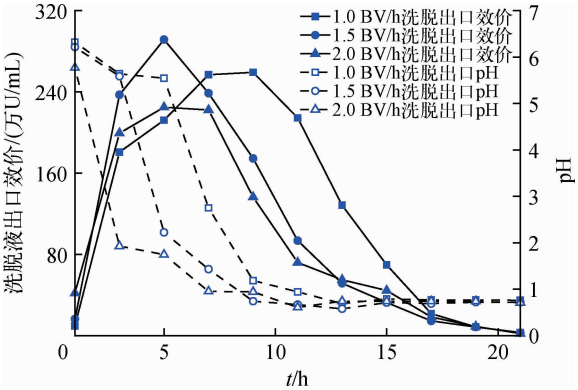


图 9 单柱洗脱曲线

Fig. 9 Single column elution curve

从图 9 可看出,当洗脱液流速在 1.0～1.5 BV/h时,洗脱曲线峰型较好,没有出现明显的拖尾;当洗脱流速为 2.0 BV/h 时,虽能较快回收高效价段,但拖尾比较明显,且 pH 降低较快。所以确定适宜的洗脱液流速为 1.0～1.5 BV/h,此时洗脱液效价较高且 pH 较为适中,有利于后续工艺进行。

2.6　生产工况性能评价

2.6.1　运行评价

在 3 柱串联吸附工艺下，相比第 1 吸附周期，D152 树脂的第 2 周期和第 3 周期的平均吸附量分别增加 25.90%和 53.85%。从洗脱曲线来看，在 8 h 切柱周期内，洗脱液总 pH 在 2.0 左右，高效价段较为集中。连续运行周期内各柱吸附量变化和洗脱曲线见图 10～图 11。

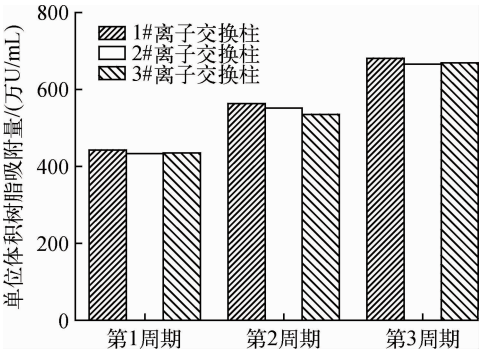


图 10　不同周期吸附量

Fig. 10　Adsorption capacity of different cycles

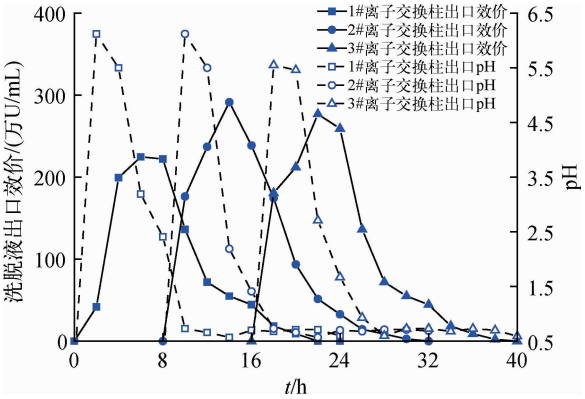


图 11　周期内各柱洗脱曲线

Fig. 11　Elution curve of each column in the period

2.6.2　收率评价

根据生产数据统计：吸附平均收率为 98.96%，洗脱平均收率为 99.18%，提取总收率为98.15%。可以看出，D152树脂对多粘菌素E提取效果良好，平均收率达 98.0%以上。收率损失主要包括：1)吸附废水中约有 0.3%～0.5%的损失；2)在实际生产过程中，D152 树脂碱性再生 pH 控制在 11.60 以下（否则耗水量将急剧增加），碱性较强的环境会造成多粘菌素 E 变性，导致收率损失。

2.6.3　D152 树脂性能评价

为了考察 D152 树脂在实际生产中的性能变化，在树脂运行 6 个月时进行了理化性能分析检测，并将检测结果与新树脂指标对比（表 1）。

表 1　D152 树脂运行 6 个月前后理化性能对比

Table 1　Comparison of physicochemical properties of D152 resin before and after 6 months operation

指标	新树脂	运行 6 个月的树脂
外观	乳白色球状颗粒	黄色球状颗粒
粒度/%(0.27～1.0 mm)	90	89
水分/%	70.4	71.2
湿视密度/(g/mL)	0.8	0.8
干氢型树脂交换当量/(mmol/g)	8.9	8.8
对硫酸粘菌素吸附量/(万 U/mL)	685	672
机械强度/%	92	91
提取多粘菌素 E 总收率/%	98.20	98.11

从表 1 可看出，D152 树脂在运行 6 个月后，理化性能指标基本保持稳定。由于受反洗操作影响，树脂在使用过程中会出现磨损；但树脂交换当量变化不大，与新树脂相当。

3 结论

用 D152 树脂提取多粘菌素 E 时，控制过滤液效价 30 万 U/mL、pH 6.0～7.0、吸附流速 1.0 BV/h、树脂装量径高比 2∶5、洗脱剂硫酸浓度 0.3～0.4 mol/L、洗脱流速 1.0～1.5 BV/h，采用 3 柱串联吸附工艺，更适合现有生产设备。此时，D152 树脂吸附量可达 680 万 U/mL 湿树脂，洗脱液 pH≥1.80，总收率≥98.0%，得到的洗脱液效价稳定。

参考文献：

[1] 乔涵，游雪甫，李聪然. 多黏菌素抗菌机理及耐药机制研究进展[J]. 中国抗生素杂质，2019，44(7)：770-777.

[2] 刘小康，李帅华，张梦珂，等. EDTA 对黏菌素体外抗菌活性的影响[J]. 江西农业学报，2020，32(11)：106-110.

[3] 王崔岩，郭月玲，彭亮，等. 多粘菌素 B 研究进展[J]. 煤炭与化工，2014，37(8)：23-30.

[4] 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.

[5] 马文艳，潘忠成，王卫富，等. 发酵液中分离多粘菌素 E 的生产工艺研究[J]. 绿色科技，2019，(22)：186-189.

[6] 丁绪芹，张劲松，王福岭. 沉淀法分离硫酸粘杆菌素工艺研究[J]. 中国兽药杂质，2013，47(6)：27-30.

[7] 杨立国. 沉淀法提取硫酸粘菌素工艺优化研究[D]. 天津：河北科技大学，2016.

[8] 杨小虎. 硫酸多粘菌素 B 分离纯化工艺研究[D]. 杭州：浙江大学，2020.

[9] 邢伟玲，周希贵，王贺祥，等. 离子交换层析法提取粘杆菌素的研究[J]. 中国兽医杂质，2003，39(11)：44-46.

[10] 何淑旺，李树英，刘长涛，等. 离子交换树脂提取硫酸粘菌素的性能对比研究[J]. 潍坊学院学报，2016，16(2)：20-23.

[11] 杨欣，翁连进，甘林火，等. D152 弱酸性离子交换树脂吸附 L-组氨酸[J]. 华工科技，2005，13(5)：1-4.

[12] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[M]. 北京：中国农业出版社，2020.

[13] 国家环境保护局. 水质钙和镁总量的测定 EDTA 滴定法：GB/T 7477—1987[S]. 北京：中国标准出版社，1987.

[14] 杨立国，赵金芳，刘俊果. 硫酸黏菌素稳定性的研究[J]. 中国抗生素杂志，2016，41(2)：113-116.

[15] 陈勇，张小华，卓文海. 硫酸粘杆菌素稳定性研究[J]. 齐鲁药事，2012(8)：440-441.

[16] 蔡元宁. 多粘类芽孢杆菌稳定性以及多粘菌素 E 发酵工艺的研究[D]. 杭州：浙江工业大学，2014.

[17] 顾觉奋. 离子交换与吸附树脂在制药工业上的应用[M]. 北京：中国医药科技出版社，2008.

Study on Extraction Performance of Polymyxin E with D152 Resin

ZHAO Zhenzhong, LI Haichao

(Hebei Shengxue Dacheng Pharmaceutical(Tangshan) Co., Ltd., CNNC, Tangshan 064000, China)

Abstract: Polymyxin E is produced by fermentation of Bacillus polymyxa. It was usually purified by ion exchange. The extraction indexes of polymyxin E by D152 (weak acid cation resin) was studied, and the adsorption capacity, elution rate and yield of polymyxin E were obtained by matching D152 resin with the existing process equipment. The adsorption capacity of D152 resin can reach 6.8×10^6 U/mL(wet resin), and the total yield is ≥98.0% under the pH of polymyxin E filtrate in 6.0～7.0, the chromatotiter in 3.0×10^5 U/mL, the adsorption velocity of 1.0 BV/h and sulfuric acid elution velocity of 1.0～1.5 BV/h under the chromatotiter was adsorbed by three columns in series. After 6 months of continuous operation, D152 resin has stable performance.

Key words: polymyxin E; D152 resins; ion exchange