

D152 树脂预洗工艺对大观霉素质量的影响

王成, 李海超

(河北圣雪大成制药有限责任公司, 河北 石家庄 051430)

摘要: 大观霉素(Spectinomycin)是一种碱性水溶性氨基糖苷类抗生素,由壮观链霉(Actinospectacin)发酵产生。在用 D152 树脂提纯大观霉素过程中,引入 EDTA-2Na 预洗工艺,通过选择合适的预洗液浓度、pH 和流速,实现高纯度盐酸大观霉素的提取,并确定了 EDTA-2Na 的回收工艺。研究得到了最佳预洗工艺参数:EDTA-2Na 洗液浓度为 0.015 mol/L,预洗液 pH 为 7.5~8.0,流速为 1.0~2.0 BV/h。该工艺简便易行、成本低、回收率高,保证了 D152 树脂的吸附收率,实现了绿色提取。

关键词: 大观霉素;D152 树脂;预洗工艺;EDTA-2Na

中图分类号: TQ465;O647.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-8063(2024)03-0068-06

DOI: 10.13426/j.cnki.yky.2024.03.07

大观霉素是一种广谱类抗生素,对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均有抗菌作用,是治疗急性淋病的首选药物^[1]。由于其毒性低,也常被用作饲料添加剂,以促进牲畜生长^[2]。目前大观霉素的市售产品有盐酸盐、硫酸盐,二者均为结晶水合物。大观霉素作为氨基糖苷类抗生素^[3],其游离碱及其盐类均易溶于水,难溶于乙醇、丙酮等有机溶剂;热稳定性较差,在不同程度的碱性及酸性条件下易发生降解反应^[4]。

目前,国内主要采用离子交换—结晶工艺提取盐酸大观霉素^[5]。壮观链霉素发酵液经草酸酸化后,用陶瓷膜或板框^[6-7]去除菌渣得到过滤液;过滤液经 D152 树脂吸附、HCl 洗脱后得到洗脱液;洗脱液经超滤、纳滤膜处理,并溶析结晶后得到盐酸大观霉素成品粉。在实际生产中,过滤液中仍存在大量的残糖、蛋白质、色素、Ca²⁺、Mg²⁺等物质,这些物质均会被 D152 树脂吸附,进而随洗脱液进入后续工序,最终造成工艺控制不稳定以及产品质量下降。金属离子也会导致超滤膜污染^[8-9]。

对吸附饱和的 D152 树脂一般利用浓度较低的酸和碱进行预洗^[10-11],但预洗效果较单一,仅能去除部分一价金属离子及少量有机物质。ED-

TA-2Na 作为一种配合剂,常用于锅炉清洗^[12-13]以及离子交换过程中稀有金属的回收^[14-15],但作为抗生素预洗液应用较少。因此,笔者对 EDTA-2Na 预洗 D152 树脂工艺进行了研究,并出于经济性考虑,对从预洗废液中回收 EDTA 的工艺进行研究。

1 试验部分

1.1 设备仪器与试剂

设备仪器:Waters e2695-2489 高效液相色谱仪(蒸发光检测器);pHS-3C 型精密酸度计;电子天平(美加宁 MJN-681);机械搅拌器;超滤膜、纳滤膜、反渗透膜(上海奥赛分离技术工程有限公司),超滤膜分子量为 8 000 Da,纳滤膜分子量为 200 Da;水环真空泵;离子交换柱(ϕ 40 mm \times 250 mm);蠕动泵等。

试剂:HCl、EDTA-2Na、丙酮,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(16~50 目)90%,水分 70.4%。

试验样品:大观霉素过滤液、盐酸大观霉素成品粉(批号 D1-240102-1),河北圣雪大成唐山制药有限责任公司。

收稿日期:2024-03-30

第一作者简介:王成(1985—),男,河北石家庄人,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。

1.2 树脂预处理

将D152树脂装柱,用3.0%的氢氧化钠溶液再生,再生结束后用无盐水洗涤树脂至 $\text{pH} \leq 11.60$,备用。

取再生后的D152树脂装柱进行吸附,吸附流速为1.0 BV/h;待出口效价为进口效价的10%时,视为吸附饱和,结束吸附操作。将吸附饱和的D152树脂,用无盐水洗涤,水洗至清液透光度为80%时结束,备用。

1.3 试验方法

1.3.1 工艺流程

1)预洗工艺:用EDTA-2Na溶液对吸附饱和的D152树脂进行预洗;2)洗脱工艺:用3.0%~4.0%的HCl进行洗脱,洗脱液流速为1.0 BV/h;3)超滤、纳滤过滤处理:超滤运行压力为0.6 MPa,纳滤运行压力为1.0 MPa;4)活性炭脱色:按照每 1×10^8 U投加1 kg活性炭进行脱色;5)结晶干燥:以1.0 BV/h流速向浓缩液中流加丙酮,加入丙酮总量为所加浓缩液体积的4.0倍,养晶2.0 h,抽滤后干燥,干燥温度为 40.0°C 。

1.3.2 检测方法

根据2020版兽药典^[16]规定方法进行样品检测。

1.3.3 pH对大观霉素稳定性的影响

取适量成品粉,用无盐水进行溶配,溶液效价为2 000 U/mL。取3份溶液用1 mol/L的NaOH调节溶液pH为7.5、8.0、9.0,控制机械搅拌器转速为1 000 r/min;每2 h采用高效液相色谱法检测效价,记录溶液效价变化情况。

1.3.4 预洗液种类选择

分别配制0.01 mol/L EDTA-2Na溶液和0.02 mol/L稀HCl溶液。取2份1.2节吸附饱和的D152树脂,每份250 mL,分别用上述溶液进行预洗,预洗流速为1.0 BV/h,每1 h对出口样品进行检测,记录预洗液中Ca/Mg含量、效价变化情况。

1.3.5 预洗液pH的影响

配制0.015 mol/L EDTA-2Na溶液3份,pH分别调整为7.5、8.0、8.5。取3份1.2节吸附饱和的D152树脂(每份250 mL),分别用配制好的溶液进行预洗,预洗流速为1.0 BV/h;每1 h对出口样品进行检测,记录预洗液中Ca/Mg含量、效价变化情况。

1.3.6 预洗液浓度选择

分别配制0.01、0.015、0.02 mol/L EDTA-2Na溶液,调整其pH至7.5。取3份1.2节吸附饱和的D152树脂(每份250 mL),分别用配制好的溶液进行预洗,预洗流速1.0 BV/h;每1 h对出口样品进行检测,记录预洗液中Ca/Mg含量、效价变化情况。

1.3.7 预洗流速选择

取3份1.2节吸附饱和的D152树脂(每份250 mL),用0.015 mol/L EDTA-2Na溶液进行预洗,预洗流速分别控制在1.0、2.0、3.0 BV/h;每1 h对出口样品进行检测,记录预洗液中Ca/Mg含量、效价变化情况。

1.3.8 EDTA-2Na回收工艺确定

按照上述预洗条件对D152树脂进行预洗,并对预洗废液进行回收。用反渗透膜(1812卷式实验膜,操作压力1.5 MPa,通量5~10 L/h,循环体积10 L)对预洗废液进行浓缩,浓缩至原体积1/15后停止浓缩操作。将浓缩液分成3份,分别调整pH至1.0、1.5、2.0,搅拌放置4 h;抽滤干燥恒重。计算EDTA回收率。

1.3.9 预洗工艺评估

根据上述优化条件,按照1.3.1描述的工艺流程制备成品粉,并对中间体料液质量及总收率进行评估。

2 试验结果与讨论

2.1 pH对大观霉素稳定性的影响

盐酸大观霉素稀溶液在不同pH下,效价变化见图1。大观霉素在弱碱性条件较为稳定,但是随着pH升高,大观霉素迅速降解,导致效价降低。大观霉素在碱性条件下降解生成杂质 $\text{B}^{[4]}$,所以预洗过程应避免使用强碱性物质,且吸附饱和后的D152树脂不宜长时间浸泡在碱性溶液中。

2.2 预洗工艺参数确定

2.2.1 预洗液种类选择

在相同阳离子强度下,EDTA-2Na、HCl对D152树脂的预洗效果见图2。对于吸附大观霉素后的D152树脂,采用稀HCl预洗造成的收率损失较大,且去除+2价金属离子的效果较差,不宜采用酸洗液;采用EDTA-2Na预洗效果较好,大观霉素收率损失较小,去除 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的效果较好。

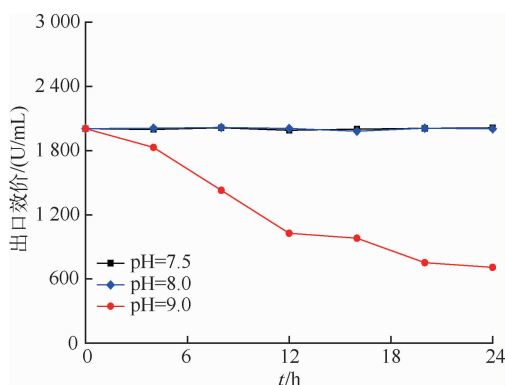


图 1 pH 对大观霉素稳定性的影响

Fig. 1 Effect of pH on the stability of spectinomycin

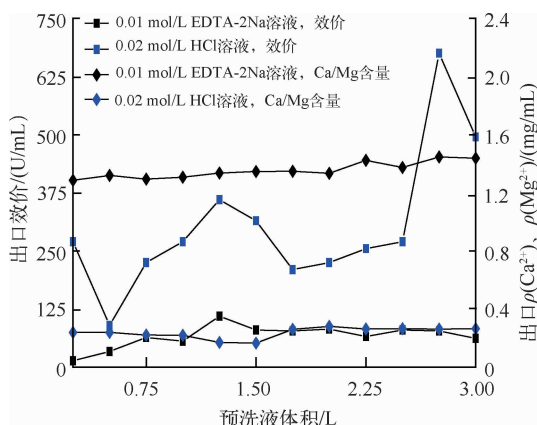


图 2 不同溶液的预洗效果

Fig. 2 Prewashing effect of different solutions

这主要是因为 D152 树脂上的 $-\text{COONa}$ 为弱酸性基团,与 H^+ 结合速率较快,进而置换出已经被吸附的大观霉素离子;大观霉素离子为 +2 价,其活性与 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 相似,所以同时被酸洗脱,这就是用稀 HCl 预洗造成收率损失的原因。而 EDTA 在中性、碱性条件下主要存在形式为 H_2Y^{2-} 、 HY^{3-} 、 Y^{4-} [17],所以在预洗中只发生金属离子交换反应,即: Na^+ 与 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 交换,能高效去除 D152 吸附的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 。但工业 EDTA-2Na 中可能存在部分 EDTA-4Na,EDTA 与 Mg 螯合时形成 EDTA-Na-Mg 盐,导致多余部分 Na 呈游离态;游离的钠离子浓度过高,会洗脱 D152 树脂吸附的大观霉素,造成收率降低,这就是 EDTA-2Na 预洗时出口有少量效价的原因。

2.2.2 预洗液 pH 的影响

以 EDTA-2Na 溶液作为预洗液,预洗液 pH 对饱和 D152 树脂预洗效果的影响见图 3。

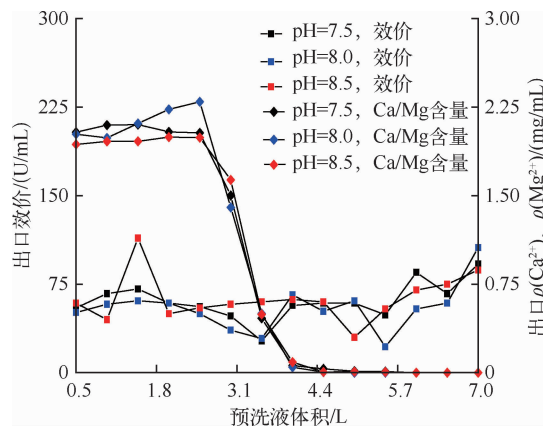


图 3 EDTA-2Na 溶液 pH 对预洗效果的影响

Fig. 3 Effect of pH of EDTA-2Na solution on prewashing effect

大观霉素发酵液经草酸酸化后,大部分 Ca^{2+} 被去除,但是 Mg^{2+} 的去除效果较差,所以 D152 树脂吸附大量 Mg^{2+} 。由图 3 可看出,在弱碱性 pH 条件下,能去除被吸附的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 。综合考虑预洗液 pH 调节成本和大观霉素的稳定性,预洗液 pH 以 7.5~8.0 为宜。

2.2.3 预洗液浓度选择

用不同浓度的 EDTA-2Na 溶液预洗 D152 树脂时,出口 Ca/Mg 含量以及效价变化见图 4。

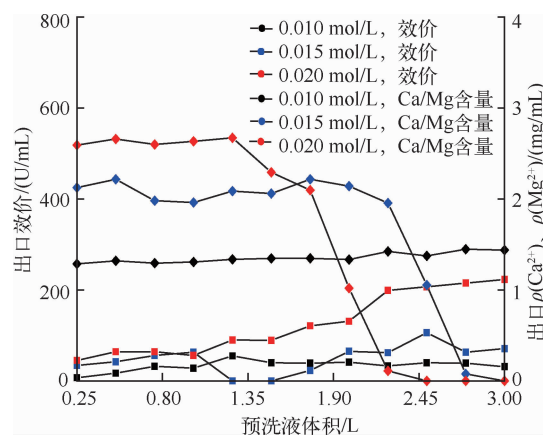


图 4 EDTA-2Na 预洗液浓度对预洗效果的影响

Fig. 4 Effect of concentration of EDTA-2Na solution on prewashing effect

随着 EDTA-2Na 浓度增加,出口 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 含量增加,需要的预洗时间缩短;但在预洗后期出口效价呈明显升高的趋势,收率损失增加。这是由于随着预洗的进行,D152 树脂上吸附的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 总量降低,无法消耗大量的 Na^+ ,此时高浓度的 Na^+ 发挥了洗脱效果。为了避免收率损失,可以在预洗液中添加一定浓度的大观霉素,然后进行二次吸附,但这样会增加操作难度。所以,出于实际生产考虑,预洗液浓度选择 0.015 mol/L 为宜,用量为 10 倍树脂体积。

2.2.4 预洗流速选择

EDTA-2Na 溶液在不同流速下对 D152 树脂的预洗曲线见图 5。可以看出, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 的去除效率、收率损失均与流速基本呈正相关性,流速越高,去除 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 效率越高,但收率损失更大。根据实际生产情况,高流速会造成离子交换柱承压增大,所以确定预洗流速为 1.0 BV/h 。

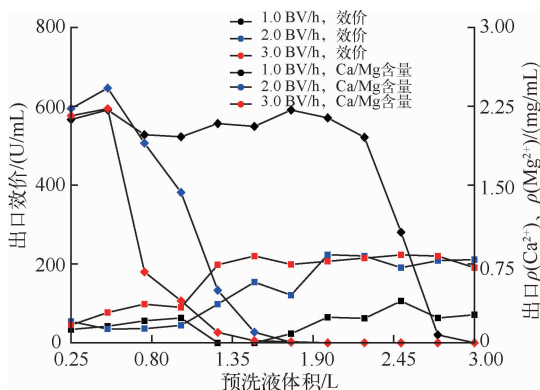


图 5 EDTA-2Na 溶液流速对预洗效果的影响

Fig. 5 Effect of flow rate of EDTA-2Na solution on prewashing effect

2.2.5 预洗工艺参数

综上所述,确定预洗工艺参数为:EDTA-2Na 浓度 0.015 mol/L 、预洗液 $\text{pH}=7.5\sim 8.0$ 、预洗流速 1.0 BV/h 、预洗剂用量为 10 倍树脂体积。

2.3 EDTA-2Na 回收工艺确定

EDTA 溶解度较低,通常采用其钠盐作为洗液。EDTA-2Na 购买成本较高,排放易造成水体污染,目前回收 EDTA 的方法主要是酸析结晶法^[18],即通过对废液进行酸化,析出 EDTA 晶体。使用回收的 EDTA 时,用碱水将其溶解得到 EDTA-2Na。

从清洁生产角度出发,试验首先采用反渗透膜回收预洗废液中的水,然后再用结晶法对浓液中的 EDTA 进行回收,EDTA-2Na 回收率为 93%以上,EDTA 在不同条件下回收率见表 1。在 EDTA 进行回收时,结晶 pH 应控制在 $1.0\sim 1.5$ 左右,结晶 pH 过高,回收率降低; pH 过低,成本增加。

表 1 EDTA 回收率
Table 1 EDTA recovery rate

pH	EDTA-2Na 用量/g	EDTA 回收量/g	EDTA 回收率/%
1.0	560	470	96
1.5	560	456	93
2.0	560	392	80

注:回收率计算时,需将 EDTA-2Na 折算至 EDTA 形式。

2.4 预洗工艺评估

2.4.1 预洗工艺对洗脱液质量的影响

D152 树脂预洗前后,洗脱液质量相关指标见表 2。可以看出,洗脱液预洗后,硬度明显降低,透光度明显提升。这是由于高浓度的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 会引起蛋白质聚集,导致洗脱液透光度降低;而预洗工序能将 D152 树脂吸附的部分蛋白质洗脱,进而降低洗脱液中的蛋白含量。

表 2 洗脱液质量对比

Table 2 Quality comparison of eluent

工艺	洗脱液 pH	洗脱液 效价/(U/mL)	洗脱液总 硬度/(mg/mL)	透光 度/%
未预洗	4.19	23 956	9.85	23
预洗	4.45	23 893	0.02	67

2.4.2 预洗工艺对膜通量的影响

预洗前后膜通量衰减趋势见图 6。可以看出,D152 树脂未经预洗,得到的洗脱液中存在大量有机杂质,导致超滤膜通量急剧衰减;另外,洗脱液中存在的大量 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 会导致纳滤膜出现浓差极化现象,纳滤膜通量也呈明显下降趋势。EDTA-2Na 预洗工艺能有效缓解超滤膜运行难度,并在很大程度上减缓纳滤膜的浓差极化现象,为结晶工序提供更高浓度的料液。

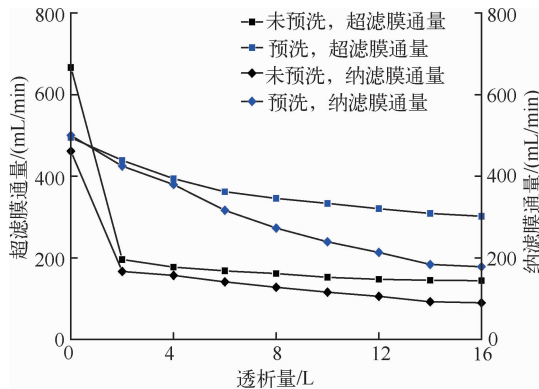


图6 预洗工艺对膜通量的影响

Fig. 6 Effect of prewashing process on membrane flux

2.4.3 预洗工艺对成品粉质量的影响

按照药典要求,对预洗前后的成品粉进行检测,部分指标见表3。可以看出,D152树脂预洗后,对应成品粉的大观霉素含量以及生物效价均有明显提升;EDTA-2Na溶液预洗能解决成品粉浊度差的问题。这是由于在溶析结晶时,蛋白质不溶于丙酮等有机溶剂,随大观霉素晶体的析出而析出。预洗工艺能有效解决生产过程中膜污染、产品质量差等问题,具有明显的实际应用意义。

表3 预洗工艺对成品粉质量的影响

Table 3 Effect of prewashing process on quality of finished powder

工艺	大观霉素含量/%	4R-双氢大观霉素含量/%	生物效价(干品)/(U/mg)	澄清度
未预洗	91.9	3.5	766	浑浊
预洗	93.7	2.8	786	澄清

3 结论

采用EDTA-2Na溶液对D152树脂进行预洗,可有效解决大观霉素生产过程中的膜污染、产品质量差等问题。预洗工艺控制参数:EDTA-2Na溶液浓度0.015 mol/L,预洗液pH=7.5~8.0,预洗液流速1.0~2.0 BV/h,预洗液用量为10倍树脂体积。

预洗废液采用反渗透膜浓缩、酸析结晶法回收EDTA,EDTA回收率为93%~96%。

参考文献:

- [1] 朱文. 淋球菌对大观霉素耐药机制的研究[D]. 合肥:安徽医科大学,2015.
- [2] 邱楚武. 一些药物组合在仔猪饲料中的应用[J]. 兽药与饲料添加剂,2001,6(3):19-20.
- [3] 顾觉奋. 分离纯化工艺原理[M]. 北京:中国医药科技出版社,1994.
- [4] 王琰,姚尚辰,王明娟,等. HPLC-PAD法测定盐酸大观霉素含量及有关物质[J]. 中国抗生素杂志,2014,39(6):439-446.
- [5] 鲍颖. 盐酸大观霉素溶析结晶过程研究[D]. 天津:天津大学,2003.
- [6] 李标文. 应用膜技术优化大观霉素提炼生产工艺[D]. 北京:北京化工大学,2006.
- [7] 周致政. 大观霉素产业化提取工艺的研究[D]. 杭州:浙江大学,2019.
- [8] 王睿黎. 豆乳中植酸、钙镁与蛋白质的相互作用及其对蛋白质聚集的影响[D]. 北京:中国农业大学,2018.
- [9] 刘海梅,熊善柏,谢笔钧. 钙离子对白鲢鱼糜热诱导凝胶化的影响[J]. 食品科学,2006,27(8):87-90.
- [10] 焦红彦,田立,刘娟. 预洗脱技术在组氨酸提纯工艺中的应用研究[J]. 河北化工,2012,35(4):27-28.
- [11] 杨永军,杨飞,张宾. 双柱交换法提取赖氨酸工艺研究[J]. 河北化工,2007,30(6):16-17+39.
- [12] 李卫,顿小宝,宦宣州,等. 新建超超临界二次再热机组锅炉低温EDTA化学清洗[J]. 山东化工,2024,53(3):182-185.
- [13] 赵金. 锅炉化学清洗技术研究[J]. 机械管理开发,2020,35(8):266-267.
- [14] 赵磊. 废旧锂离子电池有机酸浸出回收钴、锂金属研究[D]. 扬州:扬州大学,2021.
- [15] 高一迪. 电镀污泥中锌铝镍的分离回收研究[D]. 长春:东北师范大学,2023.
- [16] 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.
- [17] 龚淑华. 无机及分析化学[M]. 广州:华南理工大学出版社,2002.
- [18] 孙滨生. 从酸洗废液中回收EDTA的研究[J]. 民营科技,2007(9):38.

