

М. А. Марынова^{1,2}, К. Р. Таранцева¹, М. И. Яхкинд¹

ИЗУЧЕНИЕ СЕЛЕКТИВНОСТИ СОРБЦИИ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕНИЦИЛЛИНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП АНИОНИТОВ

Поступила в редакцию 07.08.12. Принята к печати 24.09.12.

Исследованы сорбционные свойства слабоосновных анионитов в отношении биосинтетических пенициллинов. Показано, что слабоосновные аниониты имеют высокое сродство к пенициллинам и могут быть основой для разработки альтернативной сорбционной технологии выделения этих соединений из культуральной жидкости биосинтеза.

Ключевые слова: пенициллины, аниониты, сорбция, культуральная жидкость, биосинтез.

Одной из причин ухода российской химико-фармацевтической промышленности с лидирующих позиций в производстве биосинтетических антибиотиков и других лекарственных субстанций является сравнительно высокая себестоимость отечественных субстанций из-за применения нерентабельных и энергоемких технологий, требующих использования обширной номенклатуры сырья и значительных количеств дорогостоящих энергоносителей. Поэтому актуально создание принципиально новых подходов к получению биосинтетических лекарственных субстанций, позволяющих конкурировать с зарубежными производителями.

Основными стадиями технологической схемы производства биосинтетических антибиотиков являются биосинтез, позволяющий максимально накопить целевой продукт, и выделение, обеспечивающее высокий выход и требуемую степень очистки целевого продукта от балластных примесей разнообразной природы, неизбежно присутствующих в культуральной жидкости биосинтеза. Так как в большинстве случаев содержание экзогенного антибиотика в культуральной жидкости крайне низкое, что связано с особенностями вторичного метаболизма в микробной клетке, собственно выделению практически всегда предшествует концентрирование.

В настоящее время отечественная технология выделения антибиотиков пенициллинового

ряда основана на их экстракции из фильтратов культуральной жидкости с применением значительных объемов двух органических растворителей, что требует энергоемкой стадии их регенерации. Так, для получения 1 т технической субстанции калиевой соли бензилпенициллина требуется до 40 м³ бутилацетата и до 10 м³ бутанола [1]. Однако полностью выделить органические растворители из технологических маточников не представляется возможным, и их остаточные количества попадают в производственный сток и приводят к повышению нагрузки технологического объекта на окружающую среду [2].

Вследствие больших объемов применяемых органических растворителей регенерация становится значимой стадией технологического цикла и обуславливает как высокую себестоимость конечного продукта, так и значительные затраты, связанные с защитой окружающей среды.

В связи с этим особое значение приобретают методы препаративной хроматографии [3]. Они имеют ряд неоспоримых преимуществ: концентрирование целевых продуктов происходит в фазе полимерной матрицы сорбента; значительно снижаются объемы или полностью исключается использование органических растворителей; существует возможность выбора применяемого органического растворителя в пользу менее токсичного для окружающей среды и более легко регенерируемого.

Значимость биосинтетических пенициллинов для терапевтических целей в настоящее время невелика, однако их молекулы являются исходными продуктами для получения 6-ами-

¹ Пензенская государственная технологическая академия, 440039 Пенза, проезд Байдукова / ул. Гагарина, 1а/1.

² marynova-m.a@mail.ru, krtaar@bk.ru, yah@mail333.com

нопенициллановой кислоты (6-АПК), которая является «ядром» пенициллинов и важнейшим ключевым соединением для дальнейшей модификации или химической трансформации для получения разнообразных полусинтетических β-лактамов, широко применяемых в лечебной практике [4].

Цель данного исследования — разработка альтернативной сорбционной технологии для производства антибиотиков пенициллиновой группы.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Развитие сорбционной технологии выделения биосинтетических пенициллинов сдерживается отсутствием эффективных сорбентов. Главная проблема заключается в подборе индивидуального сорбента, имеющего высокие селективность и сорбционную емкость. В настоящее время, несмотря на достаточно высокий уровень разработки теоретических основ сорбционных процессов выделения биосинтетических продуктов, поиск селективного сорбента для извлечения целевых продуктов из сложных по составу растворов, получаемых при биосинтезе, проводится преимущественно эмпирически.

По химической природе калиевые соли основных β-лактамов пенициллинового ряда — бензил- и феноксиметилпенициллина (далее пенициллины) — являются солями одноосновной карбоновой кислоты, поэтому для их выделения возможно использование ионообменных сорбентов. Ионный обмен протекает в достаточно мягких условиях и при невысоких температурах, что является необходимым при выделении термически и химически лабильных соединений, в частности пенициллинов. Важным также является возможность изменения свойств ионитов при изменении формы сорбента или замене сильного ионита на средний или слабый. Кроме того, ионный обмен как технологический метод обладает тем преимуществом, что не требует применения значительных объемов органических растворителей. Поэтому исследование возможностей применения ионного обмена для выделения биосинтетических пенициллинов представляется перспективным.

Поскольку пенициллины являются довольно сильными кислотами, они могут участвовать в ионном обмене в форме однозарядного аниона и сорбироваться на анионитах различной основности.

В ряде работ [5 – 7] описана сорбция пенициллинов на сильноосновных анионитах группы Amberlite. Десорбция осуществлялась растворами солей, например хлорида натрия [6].

Для анионита Amberlite IRA-401 [7] при десорбции 15 % (масса/объем) водным раствором хлорида аммония и 30 % (по объему) метанола выход составил около 70 %, при 7,5 % (масса/объем) хлорида аммония и 70 % (по объему) метанола — около 100 %.

Сорбция пенициллинов на отечественных анионитах изучалась Г. В. Самсоновым с соавт. [8, 9, 10 – 13]. В экспериментах использовали среднеосновный анионит ЭДЭ-10 и ряд сильноосновных анионитов (АВ-16,18, АМС-4, АСД-3, ФАФ). При этом было отмечено, что ЭДЭ-10 обладает существенно большей сорбционной емкостью по пенициллину (7 – 8 мг-экв/г), чем сильноосновные аниониты (3 – 3,5 мг-экв/г) [9]. Однако ЭДЭ-10 обладал меньшей избирательностью.

При этом при использовании ЭДЭ-10 для сорбции пенициллинов из фильтратов культуральной жидкости десорбция не превышала 20 %, хотя для модельных растворов чистых пенициллинов она составляла не менее 97 % (десорбция водным раствором 10 % (по объему) ацетона + 0,25 М-экв/л Na_2HPO_4 + 0,25 М-экв/л Na_2SO_4) [8, 9]. Увеличение содержания в элюенте ацетона до 30 % (по объему) и другие модификации элюента позволили увеличить десорбцию после сорбции из фильтрата культуральной жидкости до 60 %, однако этого недостаточно [10]. Поэтому от использования ЭДЭ-10 для выделения пенициллинов из фильтратов культуральной жидкости впоследствии отказались, хотя возможно его использование для выделения пенициллинов из отработанного бутилацетатного экстракта и бутанольного маточника после кристаллизации, полученных по обычной экстракционной схеме [11].

Сильноосновные аниониты имеют меньшую сорбционную емкость и обладают большей избирательностью, поэтому у них описанная выше проблема проявляется в меньшей степени. Однако удовлетворительные результаты по десорбции при использовании фильтратов культуральной жидкости (до 99 %) удалось получить только для анионитов с сорбционной емкостью около 1 мг-экв/г (АСМ-4, десорбция водным раствором 1/15 М фосфатный буфер + 0,5 М триметиламина + 20 % (по объему) ацетона) [12].

При сорбции бензилпенициллина на сильноосновном анионите Amberlite IRA-401 (типичном представителе этой группы сорбентов) найдено, что его емкость по пенициллину составила около 2,7 мг-экв/г [14]. При десорбции 1 М раствором хлорида калия выход составил около 63 %. Это согласуется с полученными ранее

данными для того же анионита, что полную десорбцию можно провести только с использованием 70 % (по объему) метанола [7]. И поэтому в работе [14] сильноосновные аниониты Amberlite IRA-401, Tulsion A-27 и Dowex-1 (на основе стирола и дивинилбензола) использовали только для выделения пенициллина из маточника после кристаллизации по обычной схеме.

Также было найдено, что для сорбции пенициллинов из фильтратов культуральной жидкости можно использовать катиониты, хотя найденная для ряда отечественных катионитов сорбционная емкость по пенициллинам не превышала 1 мг-экв/г [8, 9, 15]. Предполагается, что связывание пенициллинов при этом происходит за счет образования водородной связи между пептидной группой пенициллинов и кислородом соответствующих кислотных групп сорбента, что подтверждается тем, что почти полную десорбцию можно осуществить 0,1 % (масса/объем) раствором мочевины, которая способна к образованию водородных связей и вытесняет пенициллины. Поэтому сорбцию в данном случае следует считать не ионной, а молекулярной. Этот метод сорбции не получил распространения из-за невысокой сорбционной емкости.

Поскольку в предыдущих работах не исследовали сорбционные свойства слабоосновных анионитов, нами проведен ряд экспериментов, в ходе которых оценивали эффективность этих ионитов в процессе выделения пенициллинов из фильтратов культуральной жидкости. В качестве критерия эффективности сорбента рассматривали возможность достижения максимального выхода в процессе десорбции с одновременным получением концентрированных элюатов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эффективный сорбент подбирали из числа опытных образцов слабоосновных пористых анионитов, полученных модификацией сополимеров стирола и дивинилбензола, следующих марок: АН-М-3, АН-108-7, АН-120, АН-221, АН-20, АМ-6, АН-ВП-1а (ВНИИХТ, Россия).

Первоначально процессы сорбции – десорбции пенициллинов осуществляли на модельных растворах, представляющих собой водные растворы их калиевых солей. Далее оценивали изменение селективности сорбента при проведении процесса с использованием фильтратов культуральной жидкости, полученной в условиях опытной установки химико-фармацевтического производства ОАО «Биосинтез» после направленного биосинтеза пенициллинов на ком-

плексных питательных средах продуцентом *P. chrysogenum*. Активность пенициллинов в культуральной жидкости составляла до 15000 ед/мл.

Предварительно сорбенты подготавливали по общепринятым методикам [16]. Образцы анионитов подвергали набуханию в течение 10 – 15 суток в насыщенном растворе NaCl, затем 2 – 3 раза их переводили из Cl⁻ формы в OH⁻ форму в динамических условиях, для чего использовали 6 % (по массе) водный раствор NaCl, 1 М раствор NaOH и 1 М раствор HCl. Завершенность обменной реакции определяли по отсутствию в фильтрате вытесненных из смолы противоионов. Перед работой анионит переводили в ацетатную форму с помощью 5 % (масса/объем) раствора уксусной кислоты и отмывали дистиллированной водой.

Исследование сорбционных свойств анионитов проводили в динамических условиях в стеклянных колонках диаметром 10 мм, заполненных сорбентом. Соотношение высоты уровня сорбента к диаметру сорбционной колонки — 8:1. Объем анионита в ацетатной форме для всех исследуемых образцов сорбентов составлял 35 см³. Сорбцию и десорбцию из фазы анионита осуществляли для всех исследуемых образцов с одинаковой скоростью. Масса сорбированных пенициллинов во всех случаях была постоянна и составляла около 200 г-экв/л.

Сверху в колонку подавали подвижную фазу, на выходе из колонки измеряли объем элюата, время, за которое данный объем проходил через колонку с сорбентом, и определяли скорость подвижной фазы (v):

$$v = V/\tau, \quad (1)$$

где V — объем подвижной фазы, мл; τ — время, с.

Количество адсорбированного вещества (A) определяли по формуле

$$A = \frac{c_0 - c_s}{V_a}, \quad (2)$$

где A — количество адсорбированного вещества, приходящееся на 1 мл адсорбента, мг-экв/мл; c_0 и c_s — концентрации раствора до и после контакта с адсорбентом соответственно, мг-экв/мл; V_a — объем адсорбента, мл; V_p — объем раствора, из которого идет сорбция, мл.

Содержание целевого продукта в элюате определяли по калибровочному графику поляриметрическим методом на приборе цифровом поляриметре Polamat A (Польша). Выход на стадии десорбции (η) рассчитывали по формуле

$$\eta = \frac{m_1}{m_2} \times 100, \quad (3)$$

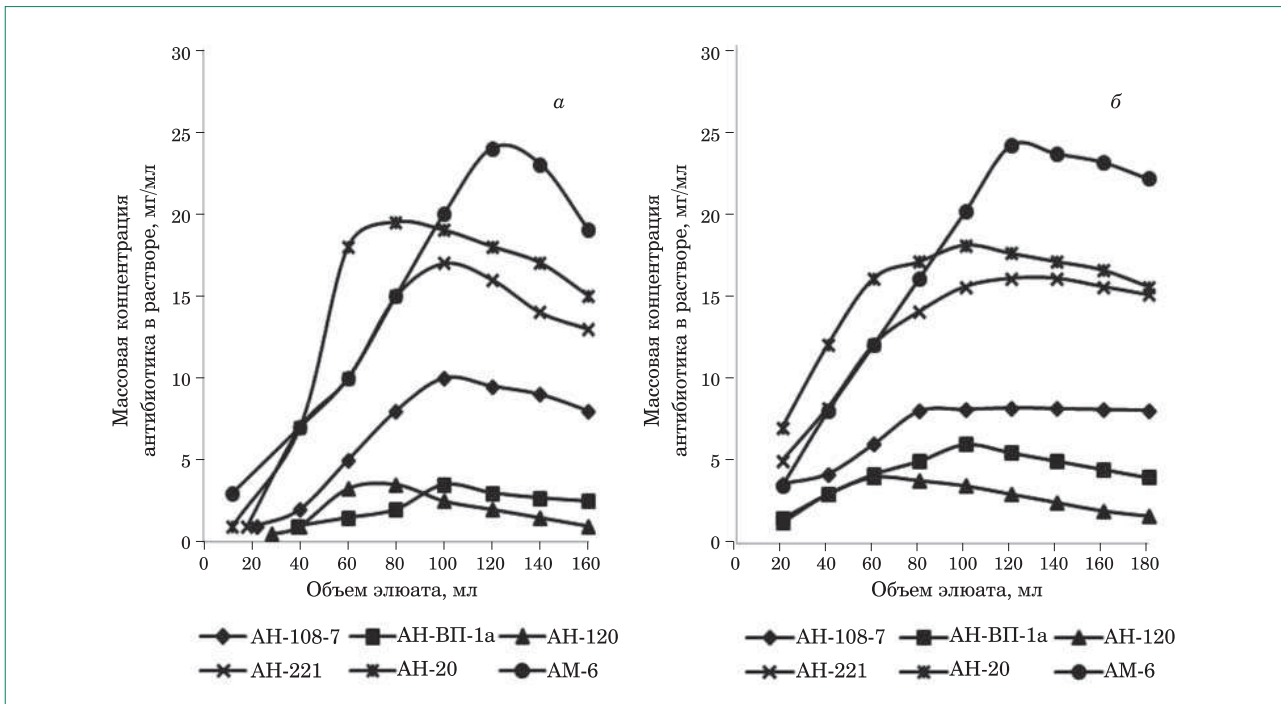


Рис. 1. Кривые десорбции пенициллинов с низкоосновных анионитов. Здесь и на рис. 2, 3: а — бензилпенициллин; б — феноксиметилпенициллин.

где m_2 , m_1 — масса сорбированного и десорбированного вещества соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Существенную роль при подборе ионогенного сорбента играют свойства функциональных групп ионитов, их взаимное расположение, пористость, выбор условий сорбции – десорбции, свойства и состав раствора.

Как видно из графического представления экспериментальных данных (рис. 1), макропористый анионит АМ-6, содержащий в качестве ионогенных групп первичные, вторичные и третичные аминогруппы алифатического ряда, имидазольные, вторичные амидные и небольшое количество карбоксильных групп, позволяет получать наиболее концентрированные элюаты, что является необходимым условием более высокого выхода целевого продукта из раствора на стадии кристаллизации.

Сравнение кривых десорбции раствором сульфатом аммония 0,2 М-экв/л для модельных растворов калиевых солей бензилпенициллина (рис. 1, а) и для феноксиметилпенициллина (рис. 1, б) позволило выявить наиболее перспективный образец сорбента – анионит АМ-6, поэтому дальнейшие исследования проводили с его использованием.

Выбор условий десорбции очень важен с точки зрения достижения полного выхода антибиотика в виде элюата высокой концентрации

при наличии минимального количества примесей. Поэтому для концентрирования пиков в последующих экспериментах увеличили ионную силу раствора элюента.

На рис. 2 представлены данные по десорбции пенициллинов с анионита АМ-6 с использованием водных растворов 0,5 М-экв/л сульфата аммония, ацетата аммония, хлорида натрия. Как следует из рисунка, наиболее концентрированные элюаты образуются при использовании в качестве элюента водного раствора сульфата аммония. Кроме того, при прочих равных условиях феноксиметилпенициллин прочнее удерживается в фазе сорбента, чем бензилпенициллин, что, вероятно, связано с тем, что феноксиметилпенициллин является несколько более сильной кислотой (константы ионизации бензилпенициллина $pK = 2,7$ и феноксиметилпенициллина $pK = 2,8$).

Выделение целевых продуктов из фильтратов культуральной жидкости промышленного производства приходится вести в присутствии значительного избытка посторонних ионов как минеральной, так и органической природы. Для эффективной сорбции пенициллинов из такой многокомпонентной смеси необходим ионит с повышенной селективностью по отношению к выделяемому веществу. Поэтому далее проводили оценку селективности анионита АМ-6 по отношению к целевым веществам в присутствии балластных соединений фильтрата культуральной жидкости (рис. 3).

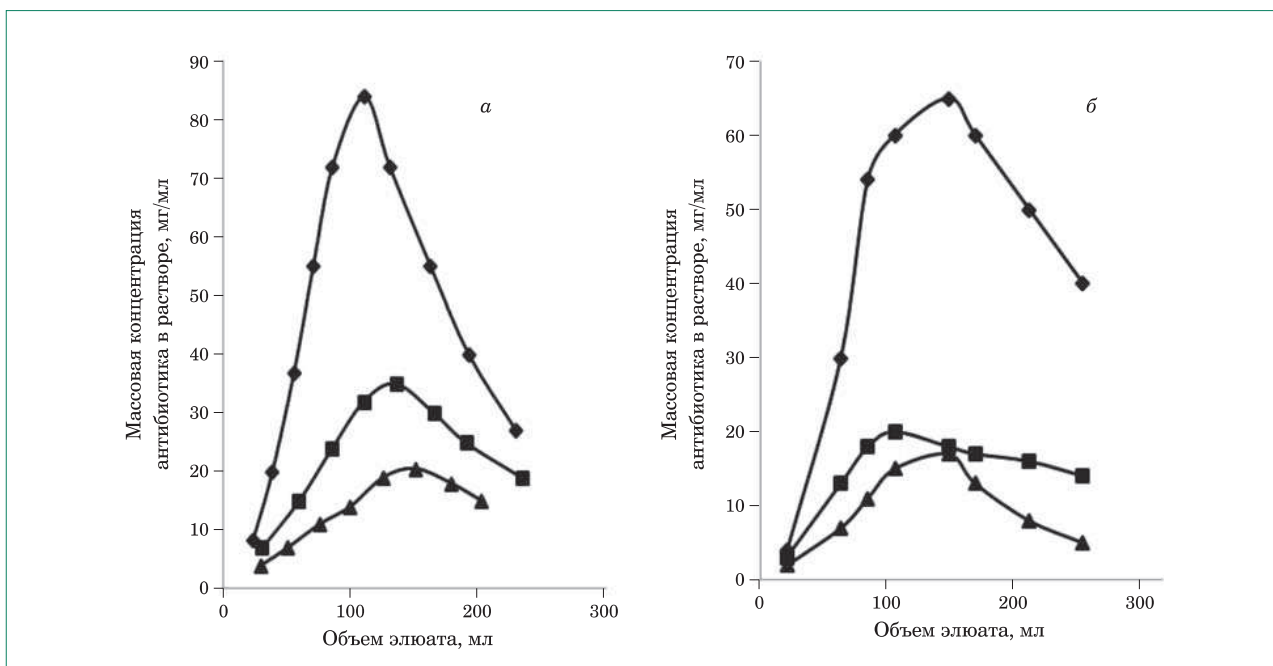


Рис. 2. Влияние состава элюента на профиль элюции с анионита АМ-6: 1 — сульфат аммония; 2 — ацетат аммония; 3 — хлорид натрия.

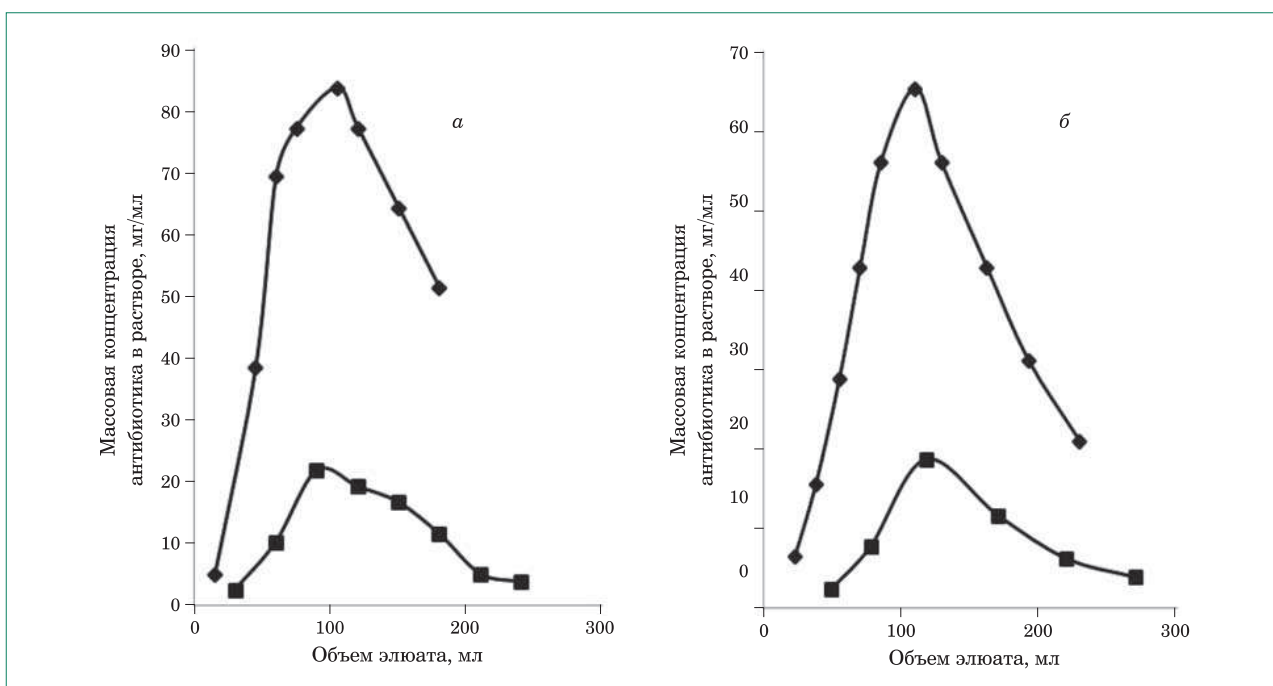


Рис. 3. Кривые десорбции пенициллинов с анионита АМ-6 раствором сульфата аммония 0,5 М-экв/л: 1 — модельный раствор, 2 — фильтрат культуральной жидкости.

Выявлено, что в случае проведения процесса сорбции – десорбции с использованием промышленного фильтрата культуральной жидкости концентрация получаемых в ходе десорбции элюатов почти в три раза ниже, чем при работе с модельными растворами. Данный факт свидетельствует о значительном снижении селективности анионита АМ-6. Этот факт согласуется с ранее полученными выводами о

конкурирующем влиянии на сорбцию сульфат- и фосфат-ионов, всегда присутствующих в фильтратах культуральной жидкости [8, 9]. Добавление к модельным растворам пенициллинов сульфатов или фосфатов уменьшает десорбцию до приблизительно 23 %, тогда как добавление хлоридов или ацетатов ее практически не уменьшает. С другой стороны, предварительное осаждение сульфат- и фосфат-ионов из

фильтратов культуральной жидкости (обработкой солями бария) увеличивает десорбцию до 93 – 95 %, однако введение этой дополнительной операции нецелесообразно.

Г. В. Самсонов с соавт. выдвинул предположение, что влияние фосфат- и сульфат-ионов на десорбцию пенициллина с анионитов объясняется возникновением дополнительных связей между сорбированным пенициллином и сорбированными анионами [8, 9, 15].

Повысить выход пенициллинов при десорбции удалось добавлением в состав элюента 30 % (по объему) органического растворителя (изопропанола или ацетона), однако содержащиеся в элюатах балластные вещества не позволили выделить из них 6-АПК. Поэтому проведение дальнейших исследований на слабоосновном анионите АМ-6 нецелесообразно.

ВЫВОДЫ

1. Низкоосновные аниониты обладают значительной динамической обменной емкостью по пенициллинам (до 200 мг-экв/мл), но низкой селективностью. При проведении процесса сорбции – десорбции пенициллинов с использованием промышленных фильтратов культуральной жидкости не удается достигнуть такой степени десорбции и очистки элюатов, которая позволяет выделить из них 6-АПК.

2. Использование слабо- и среднеосновных анионитов для выделения пенициллинов нецелесообразно из-за низкой избирательности и неполной десорбции, а высокоосновных — из-за низкой сорбционной емкости и необходимости использовать значительное количество органических растворителей для полной десорбции. Однако несомненные экологические преимущества сорбционных технологий определяют необходимость продолжения исследований с це-

люю поиска селективных сорбентов для выделения биосинтетических антибиотиков.

СПИСОК ССЫЛОК

1. Марынова М. А. Снижение загрязненности сточных вод химико-фармацевтических производств сорбционным выделением β-лактамов / Дис. канд. техн. наук. — Пенза: ПГТА., 2012.
2. Карпухин В. Ф., Файнгольд З. Л., Абрамов А. В., Кожезникова И. В., Крымский М. В. / Труды ВНИИА. 1981. № 15. С. 133.
3. Зайдель-Моргенштерн А. / Рос. хим. ж. 2003. Т. 47. № 1. С. 80 – 89.
4. Ланчини Д., Паренти Ф. Антибиотики. - М.: Мир, 1985. — 272 с.
5. Kunin R., Myers R. J. / Discuss. Faraday Soc. 1949. V. 7. P. 114 – 118.
6. McBurney C. M. Penicillin salts of anion exchange resins. United States Patent #2689227, 1954.
7. Wolf F. J., Putter I., Downing G. V., Gillin J. Ion exchange process for the recovery of ionic organic substances. United States Patent #3221008, 1965.
8. Самсонов Г. В., Веденева В. В., Селезнева А. А. / Доклады АН СССР. 1959. Т. 125. № 3. С. 591 – 594.
9. Самсонов Г. В. Сорбция и хроматография антибиотиков. — М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1960. — 175 с.
10. Самсонов Г. В., Веденева В. В., Шатик В. В., Вихорева Т. А. / Труды ЛХФИ. 1962. Вып. 15. С. 75 – 80.
11. Самсонов Г. В., Веденева В. В., Ким Д. / Труды ЛХФИ. 1962. Вып. 15. С. 81 – 92.
12. Самсонов Г. В., Веденева В. В., Завьялова Л. Н., Вихорева Т. А. / Труды ЛХФИ. 1962. Вып. 15. С. 93 – 100.
13. Веденева В. В., Кузнецова Н. Н., Коломейцев О. П., Вихорева Т. А., Самсонов Г. В. / Труды ЛХФИ. 1968. Вып. 25. С. 171 – 178.
14. Was S. N., Patwardhan S. R., Padhye V. M. / Separ. Sci. Technol. 1980. V. 15. P. 111 – 121.
15. Самсонов Г. В., Селезнева А. А., Ван И. / Труды ЛХФИ. 1962. Вып. 15. С. 101 – 104.
16. ГОСТ 10896–78. Иониты. Подготовка к испытанию.

THE STUDY OF THE SELECTIVE SORPTION OF BIOSYNTHETIC PENICILLINS USING OF DIFFERENT KINDS OF ANIONITES

M. A. Marynova^{1,2}, K. R. Tarantseva¹, M. I. Yakhkind¹

¹ Penza State Technological Academy. 440039, Penza, Baydukova / Gagarina, 1a/11

² marynova-m.a@mail.ru, krtar@bk.ru, yah@mail333.com

Sorptive properties of weak anionites in relation to biosynthetic penicillins were investigated. It was shown that the weak anionites have got high affinity to the penicillins and may be the basis to develop the alternative sorption technology of these compounds recovery from biosynthetic culture broth.

Keywords: penicillins, anionites, sorption, culture broth, biosynthesis.