

# 大孔弱酸性离子交换树脂吸附分离 庆大霉素的性能研究

蒋德旗, 蓝雪叶, 杨 丹

(玉林师范学院生命科学与技术学院, 广西玉林 537000)

**摘 要:**目的:探讨大孔弱酸性离子交换树脂 Amberlite FPC3500 吸附分离庆大霉素的性能。方法:在单因素实验基础上采用正交实验设计,研究 FPC3500 对庆大霉素粗品溶液的静态吸附、动态吸附及解吸的最佳条件,以由紫外分光光度值计算得到的吸附率、解吸率、回收率为考察指标。结果:静态吸附最佳时长为 1h, pH7.0, 室温, 转速 140r/min。在 pH 为 7.6, 样品浓度为 5.64g/L, 进样流速为 0.6mL/min, 氨水浓度为 7% 时庆大霉素的回收率可达 94.80%。结论:大孔弱酸性树脂适用于庆大霉素的分离提纯,且吸附性能优于国内常用的凝胶型强酸性树脂。

**关键词:**庆大霉素, 大孔弱酸性, 离子交换树脂, 吸附分离

## Study on adsorption and separation of gentamicin by macroporous weakly acidic ion exchange resin

JIANG De-qi, LAN Xue-ye, YANG Dan

(Life Science and Technology College, Yulin Normal University, Yulin 537000, China)

**Abstract:** Objective: In the paper, the process conditions of adsorption and separation of gentamicin by macroporous weakly acidic resin Amberlite FPC3500 were studied. Methods: Through static or dynamic adsorption and dynamic desorption experiments of resin, the preferable technical conditions of reclaiming gentamicin by FPC3500 resin were studied by using single factor experiment and orthogonal experiment, taking the adsorption rate, desorption rate and recovery ratio as the investigation index. Results: the optimal condition of static adsorption was at pH7.0 with 1h, room temperature, rotating rate of 140r/min. The recovery ratio was up to 94.8% at pH7.6, concentration of sampling 5.64g/L, flow rate of sampling 0.6mL/min, concentration of ammonia 7%. Conclusion: Macroporous weakly acidic resin was suitable for the separation and purification of gentamicin, adsorption capability was better than the commonly-used strong acid resin of gel type in our country.

**Key words:** gentamicin; macroporous weakly acidic; ion exchange resin; adsorption and separation

中图分类号: TS201.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)23-0233-04

庆大霉素是一种碱性、水溶性很强的抗生素,在中酸性环境中性质较稳定,亲和力较强,常用的分离纯化方法主要有沉淀法、泡沫分离法<sup>[1-2]</sup>、离子交换法<sup>[3]</sup>、反胶束萃取法<sup>[4]</sup>和膜分离法<sup>[5-6]</sup>。泡沫分离法和反胶束萃取法的庆大霉素回收率不高;沉淀法的回收率可达到 100%,但得到的产物纯度不高;膜分离法集分离、浓缩、提纯于一身,具有节能、不破坏产品结构和操作简单等特点,但其经济成本高,且容易引起二次污染;离子交换法不仅产品回收率高,纯度高,而且操作简单,成本低,是目前国内外分离提取庆大霉素常用方法<sup>[7-9]</sup>。国外对庆大霉素的分离主要为离子交换色谱<sup>[10-11]</sup>;国内生产上一般都采用强酸 732 树脂,这一工

艺存在交换容量低、洗脱高峰不集中、解吸收率较低和生产周期长等缺点。目前,国内外分离庆大霉素使用的多为凝胶强酸性离子交换树脂,而使用大孔弱酸性离子交换树脂提纯庆大霉素则鲜见报道。本研究对大孔弱酸性离子交换树脂 Amberlite FPC3500 吸附分离庆大霉素的工艺条件进行优化研究,探讨不同因素对庆大霉素收率等的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

硫酸庆大霉素 590U/mg, USP 级,标准品, Amresco; 庆大霉素粗品 广州齐云; D113 树脂、732 树脂 上海汇脂树脂; Amberlite FPC3500 美国罗门哈斯; 氨水、乙醇、磷酸钠等 均为分析纯。

UV755B 紫外分光光度计 深圳瑞鑫达; 离子交换柱 (20cm × 1cm) 上海锦华; PHS-3E 酸度计 上海精科; HL-2 恒流泵 上海沪西。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 庆大霉素标准曲线** 将浓度为 1000U/mL 的硫酸庆大霉素标准溶液,按顺序由 0.2~1.0mL 加入到

收稿日期: 2013-05-31

**作者简介:** 蒋德旗 (1986-), 男, 在读博士研究生, 讲师, 主要从事微生物药物分离纯化方向的研究。

**基金项目:** 广西高等学校特色专业及课程一体化建设项目 (GXTSZY022, GXTSZY220); 玉林师范学院科研项目 (2012YJQN45); 玉林师范学院教改项目 (12YJJG16)。

100mL 容量瓶中,分别加入 1.5mL 的 0.01g/mL 磷钨酸钠水溶液,稀释至 100mL,静置 0.5h 后滤纸过滤,在 249nm 波长处测定其吸光度值  $A^{[7]}$ 。

1.2.2 树脂预处理 D113、732 树脂预树脂分别按文献<sup>[12-13]</sup>进行,Amberlite FPC3500 树脂预处理:称取适量树脂,用蒸馏水漂洗至排出水清晰为止,先用 3 倍树脂体积的蒸馏水溶胀 24h,再用 3 倍树脂体积的 5% HCl 溶液浸泡 4h,接着用 10 倍树脂体积的 5% NaOH 溶液浸泡 4h,最后用 10 倍树脂体积的 5% HCl 溶液浸泡 4h,每次浸泡后都要用蒸馏水搅拌洗脱至中性。

1.2.3 树脂优选 室温下量取 D113、732、FPC3500 树脂各 5mL 置于 10mL 的 7.515g/L 庆大霉素溶液中搅拌 1h,测其残液效价计算单位湿树脂静态交换容量,将吸附后的树脂用 5% 氨水溶液 40mL 进行静态解吸。

1.2.4 庆大霉素的吸附与解吸

$$\text{平衡吸附量: } Q_e = (C_o - C_e) \times \frac{V_i}{(1-M)W}$$

$$\text{吸附率: } A(\%) = \frac{C_o C_e}{C_o} \times 100$$

$$\text{解吸率: } D(\%) = \frac{C_d V_d}{(C_o C_e) V_i} \times 100$$

$$\text{回收率: } R(\%) = \frac{C_d V_d}{C_o V_i} \times 100$$

式中: $Q_e$ —溶质的平衡吸附量, $C_o$ —吸附前溶质浓度(g/L), $C_e$ —吸附平衡时溶质浓度(g/L), $V_i$ —上样溶液总体积(L), $M$ —树脂含水量, $W$ —湿树脂质量(g), $C_d$ —解吸液溶质浓度(g/L), $V_d$ —解吸液体积(L)<sup>[14]</sup>。

1.2.4.1 吸附动力学曲线 量取 2mL FPC3500 树脂,加入 30mL 7.515g/L 庆大霉素溶液静态吸附,室温搅拌,每隔 20min 取样。

1.2.4.2 pH 对吸附的影响 分别量取 2mL 树脂,放入 50mL 锥形瓶中,加入 13mL 调节成不同 pH 的 7.515g/L 庆大霉素溶液,搅拌吸附 1h。

1.2.4.3 温度、搅拌速度对吸附的影响 分别量取 2mL 树脂,放入 50mL 锥形瓶中,加入 pH7 的 7.515g/L 庆大霉素溶液 13mL,在不同温度、不同搅拌速度下恒温水浴振荡吸附。

1.2.4.4 样品浓度、流速对吸附的影响 将四种不同浓度(9.393、7.515、5.636、3.758g/L)的 pH7 庆大霉素溶液 45mL,分别以 0.4mL/min 的流速正向通入 4mL 树脂床层进行吸附;将 5.636g/L、pH7 庆大霉素溶液 45mL 分别以 0.3、0.5、0.7、0.9、1.1mL/min 的流速正向通入 4mL 树脂床层进行吸附。

1.2.4.5 解吸液种类、解吸剂浓度对分离的影响 将 5.636g/L 庆大霉素溶液 45mL 正向通过 4mL 树脂层进行吸附,先用去离子水洗涤,再分别用 5% 的氨水、乙醇、甲醇各 32mL 动态解吸,流速为 0.7mL/min。将 45mL 庆大霉素溶液正向通过 4mL 树脂层进行吸附,先用去离子水洗涤,再分别用 3%、5%、6%、9% 的氨水动态解吸,解吸流速为 0.7mL/min。

1.2.4.6 正交实验设计 在单因素实验的基础上,建立  $L_9(3^4)$  正交实验,拟定实验方案(表 1),对 pH、样品浓度、流速、解吸剂氨水的浓度进行优化,以回收

率为指标进行考察。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Factors and levels in the orthogonal experiment

| 水平 | 因素   |                                |                                 |               |
|----|------|--------------------------------|---------------------------------|---------------|
|    | A pH | B 样品浓度<br>(g·L <sup>-1</sup> ) | C 流速<br>(mL·min <sup>-1</sup> ) | D 氨水浓度<br>(%) |
| 1  | 6.4  | 4.509                          | 0.6                             | 5             |
| 2  | 7    | 5.636                          | 0.7                             | 6             |
| 3  | 7.6  | 6.764                          | 0.8                             | 7             |

## 2 结果与分析

### 2.1 庆大霉素标准曲线

以  $A$  值为纵坐标,标准品效价为横坐标,做标准曲线如图 1,对数据进行线性回归,得到标准曲线方程: $A = 1.7816 - 0.157C$ 。式中: $C$  为庆大霉素的效价, U/mL;相关系数  $R^2 = 0.9933$ ,  $n = 3$ 。

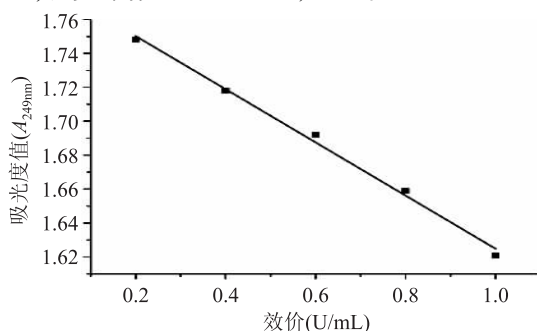


图 1 庆大霉素的标准曲线

Fig.1 The standard curve of gentamicin

### 2.2 树脂优选

结果如表 2, FPC3500 树脂对庆大霉素有较好的吸附率和解吸率,且吸附性能优于国产常用的凝胶强酸性 732 树脂。根据文献<sup>[15]</sup>可知,用 DK110 树脂提取庆大霉素静态交换容量比 732 树脂提高 50%,解吸率提高 8% 左右,而本研究使用 FPC3500 分离庆大霉素吸附率达到 95.32%,比 732 吸附率 43.23% 提升 120.5%;解吸率达到 95.56%,比 732 解吸率 68.63% 提升 39.2%。因此,后续实验以 FPC3500 作为吸附树脂进行研究。

表 2 不同种类树脂对庆大霉素吸附与解吸的效果比较

Table 2 Comparative analysis on adsorption and desorption of gentamicin by different resin

| 树脂种类   | 国产 D113 | 国产 732 | 进口 Amberlite FPC3500 |
|--------|---------|--------|----------------------|
| 结构     | 大孔      | 凝胶     | 大孔                   |
| 酸性     | 弱酸      | 强酸     | 弱酸                   |
| 吸附率(%) | 45.13   | 43.23  | 95.32                |
| 解吸率(%) | 78.59   | 68.63  | 95.56                |

### 2.3 庆大霉素的吸附与解吸

2.3.1 吸附动力学曲线 图 2 表明树脂吸附 1h 时吸附率趋于稳定,说明 FPC3500 树脂对庆大霉素的吸附量已饱和,故吸附时间取 1h。

2.3.2 pH 对吸附的影响 结果如图 3 所示,不同 pH 对

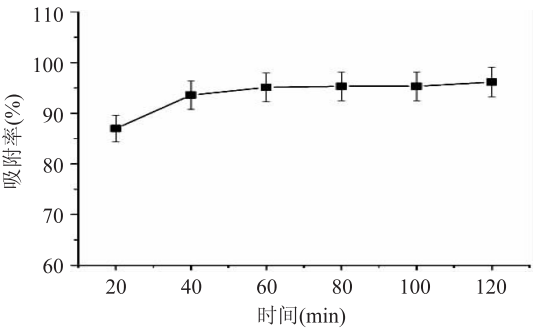


图2 静态吸附动力学曲线

Fig.2 The curve of static adsorption kinetic

吸附效果有较大的影响。FPC3500 树脂对庆大霉素的吸附率随着 pH 的增加,呈缓慢的先增加后降低的趋势,在 pH 为 7 时吸附效果最好,吸附率可达97.35%。

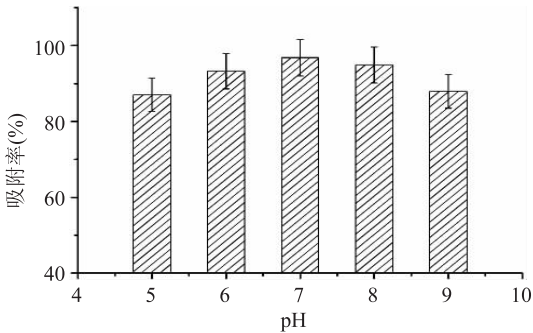


图3 pH 对吸附的影响

Fig.3 Effect of different pH value on adsorption

2.3.3 温度、搅拌速度对吸附的影响 结果如图 4 所示,不同温度对庆大霉素溶液的吸附效果影响不大,室温即可,一定的搅拌速度(140r/min)对庆大霉素

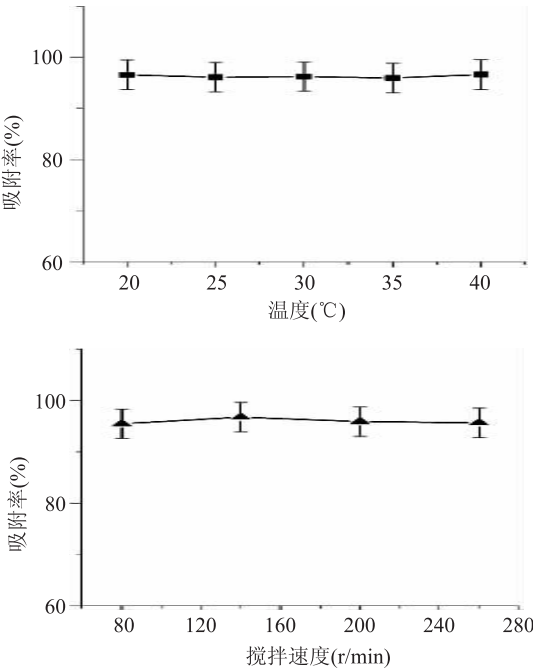


图4 温度和搅拌速度对吸附率的影响

Fig.4 Effect of different temperature and stirring speed on adsorption

溶液的吸附是必需的,速度太快破坏树脂结构反而影响吸附效果。

2.3.4 样品浓度、流速对吸附的影响 结果如图 5 所示,样品浓度最佳为 5.636g/L。流速越小越好,但是流速太慢延长操作时间,使整体效率下降,综合考虑取流速为 0.7mL/min。

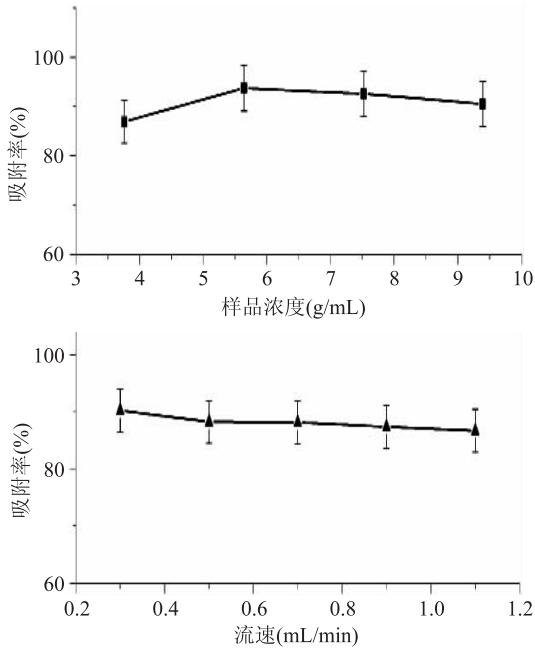


图5 样品浓度和流速对吸附的影响

Fig.5 Effect of different sample concentration and flow fate on adsorption

2.3.5 解吸液种类、解吸剂浓度对分离的影响 结果如图 6 所示,氨水解吸的效果明显比乙醇、甲醇好,解吸率可达 94.17%。氨水浓度为 9% 时解吸效果最佳,

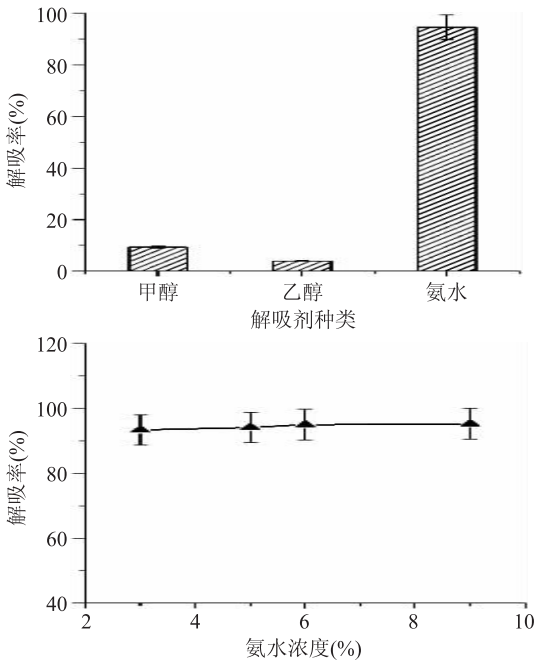


图6 解吸液种类和氨水浓度对分离的影响

Fig.6 Effect of different strippant and concentration of ammonia on separation

达到 95.24% ,但 6% 时的解吸效果与 9% 差异不显著,考虑生产成本选择 6% 作为最佳解吸液浓度。

2.3.6 正交实验优化 结果如表 3 所示,由极差分析可知,因素对庆大霉素吸附分离的影响大小为:样品浓度 > 氨水浓度 > 流速 > pH。在实验的水平范围内最优组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>,与正交表中的 8 号实验一样,即 pH 为 7.6,样品浓度为 5.636g/L,流速为 0.6mL/min,氨水浓度为 7% ,在此条件下,平均回收率达到 94.80% 。

表 3 正交实验结果直观分析

Table 3 Visual analysis of the orthogonal experiment results

| 实验号            | A     | B     | C     | D     | 回收率(%)       |
|----------------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| 1              | 1     | 1     | 1     | 1     | 92.40 ± 0.23 |
| 2              | 1     | 2     | 2     | 2     | 93.60 ± 0.38 |
| 3              | 1     | 3     | 3     | 3     | 93.63 ± 0.31 |
| 4              | 2     | 1     | 2     | 3     | 93.22 ± 0.29 |
| 5              | 2     | 2     | 3     | 1     | 92.68 ± 0.25 |
| 6              | 2     | 3     | 1     | 2     | 93.62 ± 0.33 |
| 7              | 3     | 1     | 3     | 2     | 92.40 ± 0.24 |
| 8              | 3     | 2     | 1     | 3     | 94.80 ± 0.42 |
| 9              | 3     | 3     | 2     | 1     | 93.61 ± 0.37 |
| k <sub>1</sub> | 93.21 | 92.67 | 93.60 | 92.90 |              |
| k <sub>2</sub> | 93.17 | 93.69 | 93.48 | 93.21 |              |
| k <sub>3</sub> | 93.60 | 93.62 | 92.90 | 93.88 |              |
| R              | 0.43  | 1.02  | 0.70  | 0.98  |              |

### 3 结论

大孔弱酸性离子交换树脂 Amberlite FPC3500 适用于庆大霉素的分离提纯,且吸附性能优于国内常用的凝胶强酸性 732 树脂。最佳工艺条件为:室温,pH 为 7.6,样品浓度为 5.636g/L,进样流速为 0.6mL/min,氨水浓度为 7% ,此条件下回收率达 94.80% 。

#### 参考文献

- [1] Davis D A, Lynch H C, Varley J. The application of foaming for the recovery of Surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 28(4-5): 346-354.
- [2] 王丰莉, 孙小梅, 李逢雨, 等. 用牛血清白蛋白泡沫提取硫酸庆大霉素[J]. *分析科学学报*, 2005, 21(4): 405-407.
- [3] Lisa A Kaine, Karen A Wolnik. Forensic investigation of

gentamicin sulfates by anion-exchange ion chromatography with pulsed electrochemical detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 1994, 674(1-2): 255-261.

[4] Hu Z, Gulari E. Extration of aminoglycoside antibiotics with reverse micelles [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 1996, 65(1): 45-48.

[5] Rautenbach R, Mellis R. Hybrid processes involving membranes for the treatment of highly organic/inorganic contaminated wastewater [J]. *Desalination*, 1995, 101: 105-117.

[6] Nystrom M, Kaipil L, Lupue S. Fouling and retention of nanofiltration membranes [J]. *J Membr Sci*, 1995, 98: 249-258.

[7] 范一文, 梁伟凡, 李嘉胜, 等. 庆大霉素发酵液的分离提取 [J]. *实验室研究与探索*, 2011, 30(8): 28-31.

[8] Curiel, Vanderaerden W, Hoogmartens J, et al. Analysis of underivatized gentamicin by capillary electrophoresis with UV detection [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 44(1): 49-56.

[9] Dan Li, Hao Li, Xianpu Ni, et al. Construction of a gentamicin C1a-overproducing strain of *Micromonospora purpurea* by inactivation of the *gacD* gene [J]. *Microbiological Research*, 2013, 168(5): 263-267.

[10] Sar F, Leroy P, Nicolas A, et al. Development and optimization of a liquid chromatographic method for the determination of gentamicin in calf tissues [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1993, 275(1-2): 285-293.

[11] Grote J, Himmelsbach R, Johnson D. Methodology for the rapid separation of gentamicin components and regiospecific synthesis of gentamicin conjugates [J]. *Tetrahedron Letters*, 2012, 53(50): 6751-6754.

[12] 许庆清, 杨欣, 翁连进. D113 弱酸性离子交换树脂吸附 L-组氨酸 [J]. *云南化工*, 2007, 34(6): 1-3, 9.

[13] 王鹏, 马莺. 732 阳离子交换树脂吸附蛋白质性能分析 [J]. *中国甜菜糖业*, 2005(2): 41-42.

[14] 叶发银, 杨瑞金, 华霄, 等. 大孔树脂 D392 对莱鲍迪苷 A 和甜菊苷的吸附选择性 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(23): 206-210.

[15] 刘叶青, 周文龙, 邹行彦. 大孔弱酸 DK110 树脂提取庆大霉素的研究 [J]. *华东化工学院学报*, 1987, 13(3): 320-325.

(上接第 232 页)

of *Inonotus hispidus* [J]. *Fito terapia*, 2003, 74: 483-485.

[8] 冯薇. 层孔菌属药用真菌阿里红和木蹄的化学成分与生物活性研究 [D]. 北京: 中国医学科学院, 2010.

[9] 赵芬琴, 邓丽颖, 杨灿宇, 等. 桦褐孔菌中的活性化合物桦褐孔菌醇 [J]. *药学服务与研究*, 2009, 9(6): 455-460.

[10] Reiko Tanaka, Misaki Toyoshima, Takeshi Yamada. New lanostane-type triterpenoids, inonotsutriols D, and E, from *Inonotus obliquus* [J]. *Phytochemistry Letters*, 2011(4): 328-332.

[11] Nakamura S, Iwami J, Yoshikawa M, et al. Absolute stereo structures of inoterpenes A-F from the sclerotia of *Inonotus obliquus* [J]. *Tetrahedron*, 2009, 65: 2443-2450.

[12] Ali Naa, Jansen R, Pilgrim H, et al. Hispolon, a yellow pigment from *Inonotus hispidus* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(3):

927-929.1

[13] Casalicchio G, Paoletti C, Bernicchia A, et al. Research on the amino acid composition of some fungi [J]. *Micologia Italiana*, 1975, 4: 21-32.

[14] Casalicchio G, Paoletti C, Bernicchia A, et al. Extraction, separation and identification of several organic components of basidiomycetes carpophores. II. Unsaponifiable and hydrocarbon components [J]. *Micologia Italiana*, 1975, 4(2): 29-41.

[15] 范雷法, 潘慧娟, Soccol, 等. 响应面法优化姬松茸液体发酵培养基中红糖和酵母膏溶度 [J]. *中国食用菌*, 2005, 12(3): 27-31.

[16] 徐红云, 王占斌. 粗毛纤孔菌产三萜液体条件优化 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(24): 206-214.