



УДК 544.726.3

Некоторые аспекты ионообменного выделения и осветления антибиотика полимиксина В

Кисиль Н.Н., Тырсин Ю.А.

Московский государственный университет пищевых производств, Москва

Поступила в редакцию 14.09.2014 г

Исследованы ионообменные процессы сорбции пептидного антибиотика полимиксина на карбоксильном катионите Amberlite IRC-86 в Na-форме и влияние ионов кальция на характеристики ионного обмена. Установлено, что присутствие в растворе кальция почти вдвое снижает величину сорбции полимиксина. Подтверждён осмотический механизм сорбции и её связь с набуханием ионита. Предложен ионообменный способ нейтрализации кислого элюата с одновременной кристаллизацией полимиксина-основания при температуре 5-8⁰С между зёрнами смолы. Исследован процесс осветления раствора полимиксина на ионосорбенте ИА-4, фракционный состав осветлённого раствора и кислотного элюата полимиксина со смолы ИА-4. Найден способ утилизации активной фракции путём двойного осветления раствора с высокой скоростью (2.5-3.0 объёма/ объём, час) и возвращения кислого элюата со смолы ИА-4 в процесс.

Ключевые слова: полимиксин, антибиотик, сорбция, катионит, раствор, элюат, обессоливание, смола, ионообменный процесс, выделение, осветление.

Some aspects of ion-exchange recovery and clarification of the antibiotic polymyxine B

Kisil N.N., Tyrsin Yu.A.

Moscow State University of Food Production, Moscow

The antibiotic polymyxine is very effective antibiotic against many agents of a diseases, for gram-negative infections so its industrial production too much important in our days. The subject of the article is discussion of some aspects of ion-exchange recovery of the antibiotic polymyxine which make difficulties during its production in an industrial scale. Namely: a loss of the antibiotic activity during a clearing process, a high foam-creating ability that has negative influence for vacuum-evaporation of its solution, a high sorption ability of polymyxine in the all sorbents which can clarify polymyxine solutions, racemization and an activity loss during heating process in the neutral and alkaline pH. And also some recommendations were given for obtaining the antibiotic preparation with a high activity level and shortening the production process stages. And it has been optimized the conditions of an ion-exchange purifying of polymyxine on the micropores sorbent.

For these reasons it has been investigated some sorption process of the peptidase antibiotic polymyxine on the carboxyl cationite IRC - 86 (Amberlite) in the Na⁺ - form and influence of the Ca²⁺- ions on ion-exchange characteristics. It was established that a presence of calcium nearly twice decreases polymyxine sorption comparatively with a salt-free solution. It was confirmed that an osmosis mechanism of sorption takes place and sorption depends on the ionite swelling. It was also proposed the ion-exchange method of neutralization of the acidic eluate with simultaneous crystallization of polymyxine-base between the resin grains at the temperature 5-8⁰С. It was investigated the clarification process of polymyxine solution on the ion-sorbent IA-4, the fractional composition of the clarified solution and of the the acidic eluate of polymyxine obtained on the resin IA-4. It has been proposed the method of utilization of the active fraction by double clarification of the solution with high speed (2.5-3 volume/volume, hour) and returning the acidic eluate obtained on IA-4 in the process.

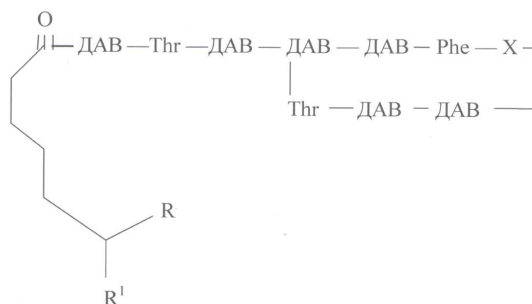
Keywords: polymyxine, antibiotic, production, sorption, cationite, solution, eluate, dissalting, resine, ion-exchange process, recovery, decoloration.

Введение

Антибиотик полимиксин В, открытый в 1947 году, проявляет высокую антибактериальную активность ко всем грамотрицательным микроорганизмам [1-3]. Из-за высокого нейро- и нефротоксического действия антибиотик редко применяли в клиниках, отдавая предпочтение менее токсичным пенициллиновым и цефалоспориновым препаратам. Положение изменилось, когда у штаммов-возбудителей заболеваний появилась и стала быстро распространяться резистентность к широко применяемым антибиотикам. Особенным бедствием для хирургических и реанимационных отделений стала синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa*, штаммы которой проявляют резистентность ко всем антибактериальным препаратам за исключением полимиксина В. Полимиксин В связывает и дезактивирует липидный полисахарид - липид А фосфолипазу, ответственный за быстротечный сепсис тяжелобольных с летальным исходом [4]. Всё это делает необходимым организацию его масштабного производства.

Теоретическая часть

Полимиксин В представляет собой циклический пептид, связанный с алифатическим ацильным остатком, например, октаноилом, общей формулы:



где ДАВ - α , γ - диаминомасляная кислота; R^1 , R - CH_3 или H; X - аминокислота.

Антибиотик имеет 4 активные фракции следующего состава [5]:

	R	R^1	X	Мол. масса
B_1	CH_3	CH_3	Leu	1204
B_{1-1}	CH_3	CH_3	I-Leu	1204
B_2	H	CH_3	Leu	1190
B_3	CH_3	H	Leu	1190

Причем наиболее предпочтительной является фракция B_1 . Пять свободных боковых α , γ -групп диаминомасляной кислоты определяют его особые фармацевтические свойства и высокую основность молекулы, делающей возможным выделение антибиотика из раствора с помощью ионообменных смол. Хотя полимиксин В был известен в 50-х годах прошлого столетия и в первые 15 лет после открытия основательно изучен, попытки его промышленного производства не были успешными. Этому препятствовали следующие факторы.

1. Быстрая потеря активности полимиксина В от стадии к стадии производственного процесса, т.к. он является идеальной питательной средой для грамм-положительных микроорганизмов.

2. Исключительно высокая пенообразующая способность антибиотика, обусловленная его молекулярной структурой, т.е. наличием в молекуле гидрофобной и гидрофильной частей, что способствует образованию прочных пленок на границе

фаз: жидкость-воздух и делает вакуум-выпарку его растворов в промышленных условиях практически невозможной.

3. Высокая сорбционная способность на всех сорбентах, которые могут осветлять растворы полимиксина В, что приводит к потерям антибиотика, причем тем большим, чем больше концентрация сорбента и продолжительность процесса.

Имеются сведения, что при первой стадии технологического процесса выделения полимиксина - микрофльтрации - антибиотик может частично деструктироваться и терять активность. Так, при прохождении через мембраны с порами $D = 0,22$ мкм растворов полимиксина с концентрацией 1000, 3000 и 5000 ед/мл активность падает на 3%. Автоклавирование указанных растворов при 115°C и $0,7$ кг/см³ в течение 30 мин приводит к падению его активности соответственно на 30, 23 и 16% [10]. Исследована стабильность антибиотика в водных растворах при рН 1.4; 3.4; 5.4 и 7.4 при температуре 37, 50 и 60°C . Антибиотик практически не теряет активности при рН до 5,4. Большие потери наблюдались при рН 7,4 и температурах 50 и 60°C [6].

Этот факт объясняют рацемизацией молекулы полимиксина В при нейтральных и щелочных рН. Имеющиеся в литературе данные о выделении полимиксина из культуральной жидкости немногочисленны. Описывается способ выделения с помощью сорбции на слабокислотных катионитах типа Амберлит IRC-50, Вофатит-С или Леватит-С, элюции полимиксина кислотой и обессоливания элюата парой колонн с катионитом и анионитом, соединенных последовательно [7-8].

В качестве одной из стадий очистки полимиксина используют обработку раствора сильно сшитого катионита Цеокарб-225. Затем продукт очищают перекристаллизацией в нафтаден-2-сульфанате [9]. Для выделения полимиксина В можно также использовать его сорбцию на жидком катионите в органическом растворителе, не смешивающемся с водой. Однако, имеющихся данных недостаточно для ясного представления о поведении антибиотика на различных стадиях процесса его выделения.

Целью настоящей работы было исследование процессов сорбции и элюции полимиксина В, влияние на эти процессы ионов кальция, изменения фракционного состава антибиотика на стадиях очистки и поиск оптимальных условий осветления.

Эксперимент

Опыты проводили на экспериментальной установке фармацевтической фирмы «Hisun Pharmaceutic. Co» в г. Тайджоу (КНР), хорошо оснащённой всем необходимым оборудованием. После окончания процесса ферментации раствор антибиотика загружали в реактор объёмом 1 м³ и охлаждали до $+8^{\circ}\text{C}$. Жидкость отделяли от биомассы на установке микрофльтрации с поверхностью мембран 10 м³ и размером пор – $0,24$ мкм. Обессоливание раствора проводили на 2-х последовательно соединённых колоннах из нержавеющей стали. Колонны были загружены по 20 л сильносшитого сульфостирольного катионита HZ-016 в H^+ -форме (производство - КНР) и анионитом Purolite A-847. Сорбцию полимиксина до обессоливания и после обессоливания осуществляли на стеклянных колоннах ($D=80$ мм; $H=1100$ мм), загруженных катионитом IRC-86 (Amberlite) в Na^+ -форме в количестве – 5.5 л. Анализ антибиотика осуществляли непрерывно на всех стадиях процесса выделения и очистки с помощью скоростного автоматического жидкостного хроматографа «Перкин Элмер». Время от начала анализа до распечатки – 12 мин. Сорбированный полимиксин элюировали 1 н раствором HCl.

Концентрирование элюата осуществляли на установке обратного осмоса с поверхностью мембран 5 м² при давлении 25 бар (производство - Франция). Кристаллизацию полимиксина проводили на специально разработанной колонне из нержавеющей стали с охлаждающей рубашкой, заполненной анионитом А-847 в ОН-форме. Для уменьшения потерь антибиотика нейтрализация соляной кислоты аммиаком была заменена на ионообменный способ поглощения кислоты с помощью анионита А-847 в ОН-форме. Одновременно, наблюдалась кристаллизация полимиксина, поскольку температура в колонне составляла 6-8°С. Выпавшие кристаллы растворялись в серной кислоте до значений рН 5.0-5.5. Для приведения показателей препарата до соответствующих нормам Фармстатьи раствор полимиксина осветляли на ионосорбенте АХ-7 (Россия), оказавшимся наиболее эффективным.

Обсуждение результатов

На рис. 1 показаны выходные кривые сорбции на катионите Amberlite IRC-86 в Na⁺-форме полимиксина из нативного раствора и из предварительно обессоленного.

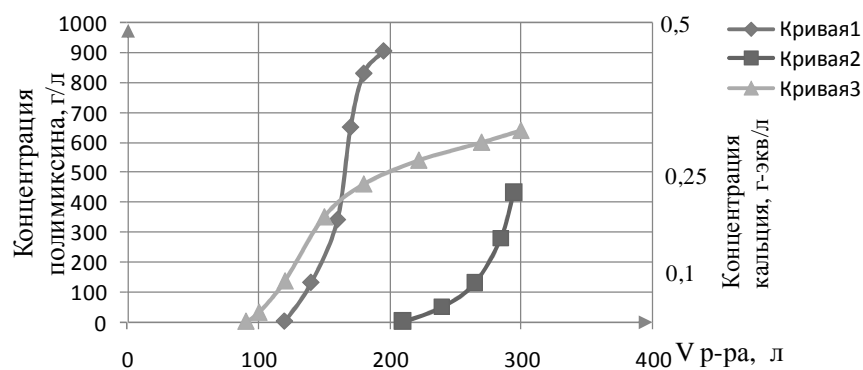


Рис. 1. Выходные кривые сорбции полимиксина на катионите IRC-86 (*Amberlite*). кривая 1 - концентрация полимиксина В в фильтрате при сорбции из нативного раствора; кривая 2 - концентрация полимиксина В в фильтрате при сорбции из обессоленного раствора; кривая 3 – концентрация кальция в растворе.

Видно, что в присутствии ионов кальция насыщение смолы наступает значительно быстрее. Реальная ёмкость смолы при сорбции полимиксина из обессоленного раствора, где единственным конкурентом является противоион – натрий, увеличивается вдвое по-сравнению с сорбцией полимиксина из первичного нативного раствора. Это является серьёзным аргументом в пользу предварительного обессоливания нативного раствора. Сравнивая выходные кривые сорбции полимиксина из обессоленного раствора (2) и кальция (3), можно увидеть, что кальций выходит с колонны значительно раньше, чем полимиксин, хотя его концентрация в растворе (0.08 г-экв/л) превышает концентрацию полимиксина (0.005 г-экв/л). Из этого можно сделать вывод, что избирательность катионита к полимиксину, имеющего в молекуле 5 свободных аминогрупп, значительно превышает его избирательность к кальцию. Кривая (3) точно изображает процесс ионного обмена $H^+ - Ca^{2+}$ ($K = 0.25$).

Большую информацию для понимания механизма процессов сорбции и элюции полимиксина даёт изменение степени набухания анионита. С целью получения этой информации колонну калибровали от объема, когда смола находится

в чистой Na-форме (5 мл/г), до объема, когда смола находится полностью в H-форме (2.5 мл/г). Объем при этом менялся почти вдвое, т.е. 50 см по высоте. Несмотря на простоту, данный метод оказался достаточно точным. Изменение набухания катионита IRC-86 при ионном обмене иллюстрирует рис. 2.

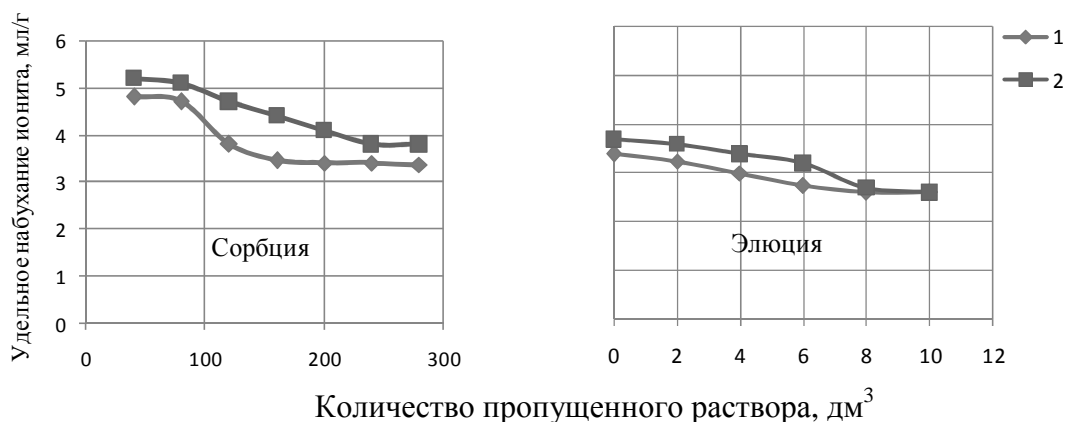


Рис. 2. Изменение набухания катионита в процессе сорбции и элюции:
кривая 1 – нативный раствор; кривая 2 – обессоленный нативный раствор.

Сравнивая кривые сорбции полимиксина с кальцием (1) и без кальция (2), можно заметить большое различие в величине удельного набухания катионита. При совместной сорбции полимиксина и кальция (нативный раствор) со смолы выходит вдвое больше ионов натрия, чем при сорбции одного полимиксина (обессоленный раствор), и соответственно, при этом больше снижается удельное набухание ионита.

Элюцию осуществляли 1 н раствором HCl. Механизм элюции (десорбции) полимиксина не является ионообменным и определяется набуханием смолы. Из рисунка видно как в правой его части удельное набухание понижается до определённого предела, достигающего 2.5 мл/г. Таким образом, высокая избирательность сорбции полимиксина определяется его многозарядностью, а при элюции играет роль осмотический фактор, т.е. сжатие ионита.

Степень очистки антибиотика в процессе ионного обмена и кристаллизации иллюстрирует рисунок 3. На рисунке 3а представлен фракционный состав нативного раствора после процесса микрофльтрации с активностью 1 850 γ/мл.

В левой части видны пики аминокептидной фракции, которая является строительным материалом для биосинтеза полимиксина В. Судя по данным формольного титрования нативного раствора и соответствующего количества стандартного образца полимиксина количество данной фракции в 6-7 раз превышает концентрацию антибиотика, что говорит о больших резервах повышения его активности.

После сорбции на катионите и элюции полимиксина его фракционный состав меняется (рис. 3б). Количество аминокептидной фракции значительно уменьшается, а пики, соответствующие V_1 и V_2 становятся более чётко выраженными.

Наконец, после кристаллизации при охлаждении в колонне и фильтрации фракционный состав образца (рис. 3с) полностью соответствует требованиям Фармстатьи, т.е. сумма активных фракций В составляет более 80% (81.5%), а количественное отношение фракций V_1 к фракции V_2 составляет более 2 (2.7%).

Однако полученный препарат содержит значительное количество пигментных веществ, что недопустимо для фармпрепаратов. Опыты по обесцвечиванию раствора полимиксина активированным углём с различной

дозировкой показали почти полное обесцвечивание (98.5%) при добавке 10% угля к объёму раствора. Однако при этом теряется активная фракция, преимущественно B_1 .

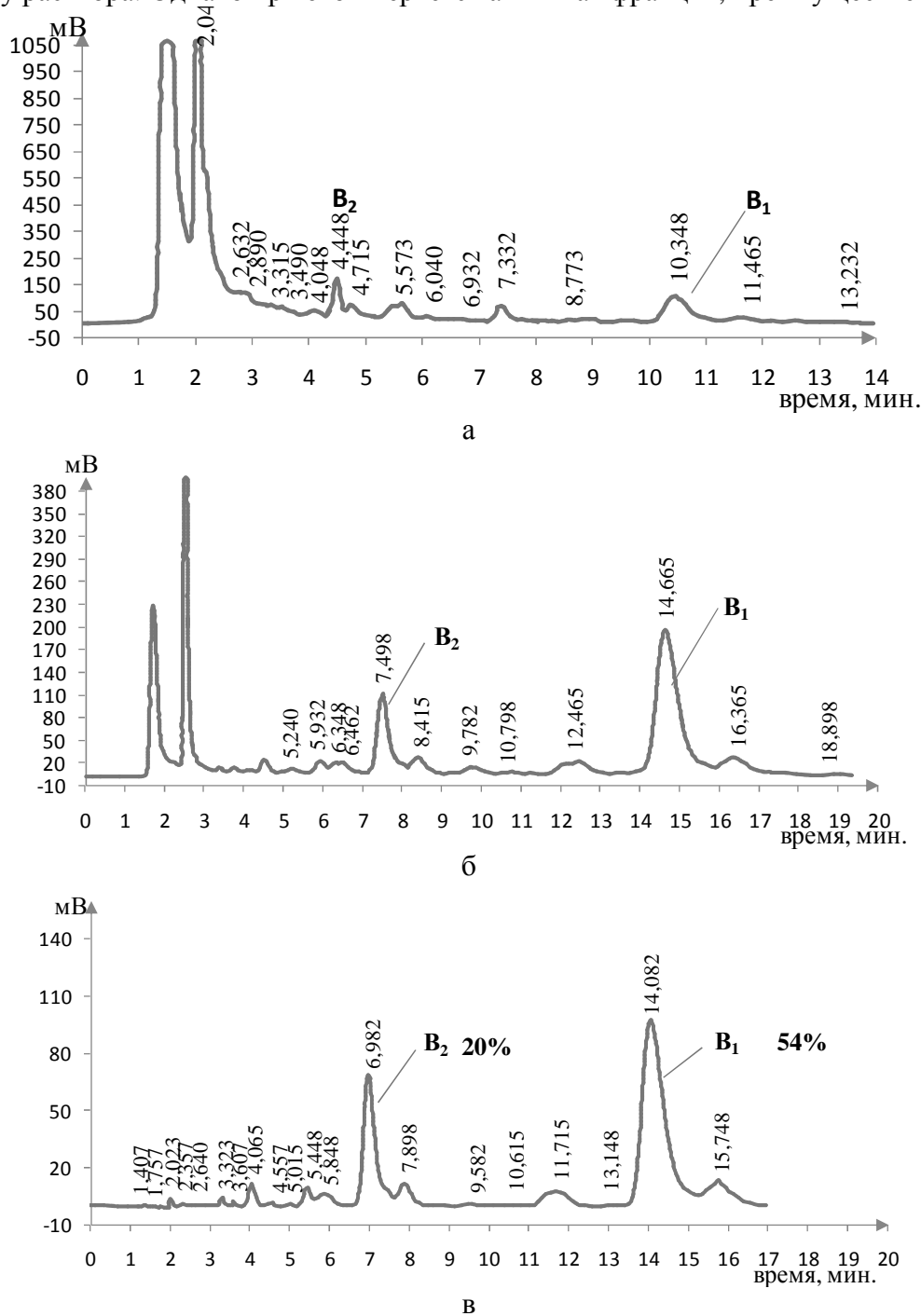


Рис. 3. Фракционный состав нативного раствора (а), элюата полимиксина (б) и антибиотика после осаждения в виде основания (в)

При поиске осветляющего сорбента был выбран наиболее эффективный – ИА-4 - продукт полимеризации фенола, формальдегида и уротропина. Ионсорбент осветляет раствор антибиотика на 99%, однако на нём вместе с пигментом сорбируется активная фракция, преимущественно B_1 . Это происходит при скорости, соответствующей максимальному осветлению, составляющей до 1 объёма на объём смолы в час. На рис. 4а представлен фракционный состав полимиксина после максимального осветления раствора.

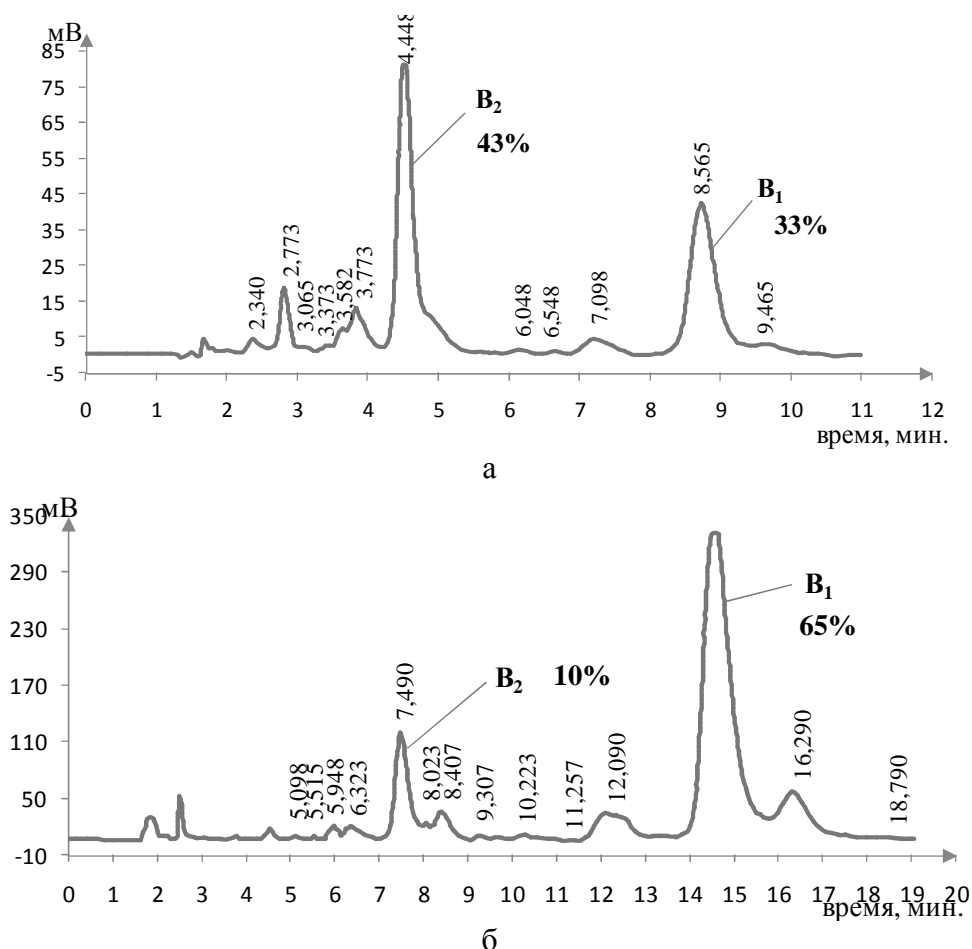


Рис. 4. Фракционный состав полимиксина после осветления (а) и элюата пигмента со смолы ИА-4 (б)

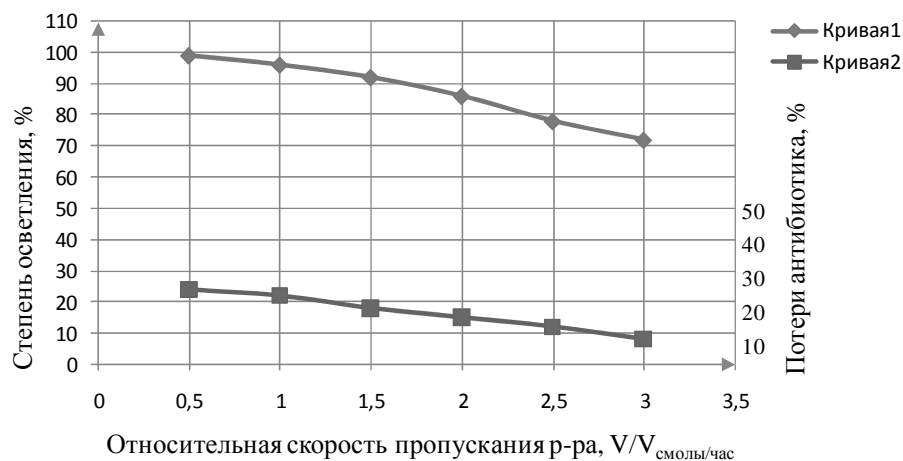


Рис. 5. Зависимость степени осветления раствора полимиксина: кривая 1 - от потери активности; кривая 2 - от скорости пропускания раствора.

Соотношение фракций B_1 : B_2 , которое до осветления было 2.7:1, составило 0.77 : 1. Ниже, на рис. 4б показан фракционный состав элюата полимиксина с ионсорбента ИА-4 1 и раствором HCl с выходом 90%. Соотношение фракций полимиксина B_1 и B_2 составило 6.5 : 1. Выход был найден в варьировании скорости осветления. Зависимость степени осветления раствора полимиксина и потери активности в осветлённом растворе демонстрирует рис. 5.

Видно, что даже при скорости потока от 2.5 до 3.0 объемов/объем смолы в час степень осветления составляет 72-78%, а потери – 8-12%. При повторном осветлении полученного осветленного раствора на такой же колонне с той же скоростью 2.5 и 3 объема на объем смолы в час степень осветления составила соответственно 95-92%, а потери активности, учитывая потери в предыдущем цикле, 19 и 15% соответственно. Однако 85% полимиксина, сорбированного при осветлении, возвращается в процесс, и выводится из цикла безвозвратно всего 3-5% полимиксина V_1 . Для оптимизации технологии осветления следует провести специальные исследования.

Заключение

Проведенные исследования показали, что для получения высокого выхода полимиксина в процессе ионообменного выделения и сокращений стадий производственного процесса, цель которых – устранение кальция перед операцией щелочного осаждения антибиотика, а также повышения доли его в катионите при сорбции, необходимо предварительно полностью удалить кальций с помощью ионообменного обессоливания.

Желателен контроль фракционного состава антибиотика на всех стадиях с помощью анализаторов ВЖХ с целью обеспечения соотношения V_1 и V_2 на требуемом уровне.

Совместить высокую степень осветления продукта с минимумом его потерь можно только при двухкратном пропускании раствора через колонки со свежим ионосорбентом и последующей элюцией антибиотика с колонн, а затем возвращением в процесс.

Список литературы

1. Cunha B.A. New uses for older antibiotics: nitrofurantoin, amikacin, colistin, polymyxin B, doxycycline and minocycline revisited // *Med. Clin. North Am.* 2006. V. 90. No.6. pp. 1089-107.
2. Щетинин Е.В. Полимиксины – новый взгляд на известные антибиотики. // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2000. № 3. С. 68-73.
3. Magdalena E., Sobieszcykl et al. Combination therapy with polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant gram-negative respiratory tract infections // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2004. V. 54. No.2. pp. 566-569.
4. Tamra M.A. et al. Polymyxin antibiotics for gram-negative infections. // *American Journal of Health-System Pharmacy.* 2007. V.64. No.8. P. 819-826.
5. Wilkinson S., Lowe L.A. Structure of Polymyxin B. // *Nature.* 1964. V. 202. No. 6. pp. 1211.
6. Ozwa Y.A. Chemical Stability of Polymyxin B. // *J. Pharm and Biomed. Soc.* 2002. V.29. No 9. pp. 2425-2435.
7. Hunter J. Pat. UK № 782926. London. 1957.
8. Larsen P., Lund E. Isolation and characterization of three new polymyxins in polymyxins B by high-performance liquid chromatography. // *Journal of Chromatography.* 1981. V. 218. pp. 653-661.
9. Hunter J. Pat. Belgia № 614802. Brussele. 1965.

References

1. Cunha B.A. New uses for antibiotics: nitrofurantoin, amikacin, colistin, polymyxin B, doxycycline and minocycline revisited, *Med. Clin. North Am.*, 2006, V. 90, No.6, pp. 1089-1097.
2. Shchetinin E. V. Polimiksiny - novyi vzglyad na izvestnye antibiotiki [Polymyxines –

the new view on the known antibiotics], *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*, 2000, No 3, pp. 68-73.

3. Magdalena E. et al. Combination therapy with polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant gram-negative respiratory tract infections, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, V. 54, No. 2, pp. 566-569.

4. Tamra M.A. et al. Polymyxin antibiotics for gram-negative infections, *American Journal of Health-System Pharmacy*, 2007, V. 64, No. 8, pp. 819-826.

5. Wilkinson S., Lowe L.A. Structure of Polymyxin B, *Nature*, 1964, V. 202, No. 6, pp. 1211.

6. Ozwa Y.A. Chemical Stability of Polymyxin B, *J. Pharm and Biomed. Soc.*, 2002, V.29, No 9, pp. 2425-2435.

7. Hunter J. Pat. UK № 782926, London, 1957.

8. Larsen P., Lund E. Isolation and characterization of three new polymyxins in polymyxins B by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, 1981, V. 218, No. 2, pp. 653-661.

9. Hunter J. Pat. Belgia № 614802, Brussele, 1965.

Кисиль Наталия Николаевна - к.х.н., доцент кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» Московского государственного университета пищевых производств, г. Москва, тел. 8(915) 223-80-40

Тырсин Юрий Александрович - д.т.н., проф. кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» Московского государственного университета пищевых производств, Москва, тел.: 8(926)5313365

Kisil Nataliya N. - the candidate of chemical science, docent of the department "Biotechnology and technology of the products of bioorganic syntheses" Moscow State University of Food Production, Moscow, E-mail: bikant.comp@mail.ru

Tyrsin Yuri A. - the doctor of technical science, professor of the department "Biotechnology and technology of the products of bioorganic syntheses" Moscow State University of Food Production, Moscow