

文章编号:1000-2235(2001)01-0053-04

超滤法提纯头孢菌素 C 的应用研究

李春艳¹, 方富林², 何旭敏³, 夏海平³, 蓝伟光³

摘要: 目的 研究既能提高滤液质量和过滤收率,又能简化操作工艺流程的提纯头孢菌素 C 发酵液的方法,并对超滤过程中顶洗加水量进行探讨。方法 采用 Ultra-flo 超滤系统提纯未经任何预处理的头孢菌素 C 发酵液。结果 滤液中蛋白质含量仅为原工艺的 1/10,过滤收率由原工艺的 78% 提高到 83.8%。系统平均膜通量可达 66.3 LMH,且可长时间连续平稳运行,被污染的膜经清洗后与新膜没有明显的差异。理论加水量倍数为投料液的 1.8 倍,实际的平均加水量倍数为 1.70 倍。结论 Ultra-flo 超滤系统完全能代替原工艺提纯不经预处理的头孢菌素 C 发酵液,理论加水量计算方法可以用于实际洗涤操作。

关键词: 头孢菌素 C; 超滤; 分离与提纯**中图分类号:** R943; R978.11 **文献标识码:** A

头孢菌素 C 是半合成头孢菌素类抗生素的起始原料,目前采用发酵法生产^[1],其发酵液中存在菌丝体、蛋白质和悬浮微粒等杂质。原工艺是将发酵液预处理后用板框加压过滤或真空鼓式过滤的两步分离法除去这些杂质,此法存在操作工艺繁琐、滤液质量不高、收率较低等问题。笔者于 1999 年 10 月~2000 年 5 月研究头孢菌素 C 发酵液提纯中使用超滤法代替原工艺,以期简化操作工艺流程,提高滤液质量和过滤收率,并对超滤过程的顶洗加水量进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料 超滤设备:Ultra-flo 超滤系统(美国下游技术有限公司)的 UF-54 中试设备。超滤膜:平板薄层复合膜,膜面积 1.08 m²,截留分子量为 30 000 的 Suntar III[#]膜。头孢菌素 C 发酵液:取自甲、乙两药厂头孢菌素 C 生产线。发酵液只经酸化(控制 pH 在 3 左右)处理,不添加任何助滤剂。含酶洗涤剂:Suntar VI 洗涤剂。

1.2 实验过程 头孢菌素 C 发酵液经泵加压后进入 Ultra-flo 超滤分离系统,头孢菌素 C 透过膜流进清液贮罐,而菌丝体、蛋白质和固体悬浮颗粒等杂质被截留,经热交换器冷却后(因泵运行后会放热使料液温度升高)送回发酵液贮罐进一步浓缩,直至超滤浓缩液呈浆糊状,再用少量的水顶洗,使滤渣中残余

的头孢菌素 C 充分洗涤出来。工艺流程见图 1。实验中每隔 15 min 测定一次过滤速率,并换算成膜通量。

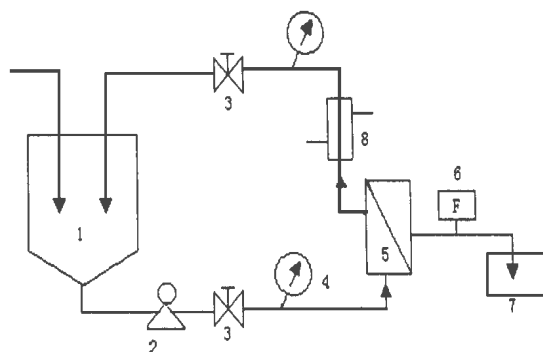


图 1 超滤工艺流程

1. 发酵液贮罐; 2. 泵; 3. 阀门; 4. 压力表; 5. 超滤系统; 6. 流量计; 7. 清液罐; 8. 热交换器

1.3 实验条件 在甲药厂开展了 5 个批次的中试,实验条件见表 1。

表 1 甲药厂头孢菌素 C 发酵液 Ultra-flo 超滤条件

中试批次	1	2	3	4	5	平均值
平均温度(℃)	22.2	21.2	19.7	20.2	21.4	20.9
平均进口压力(MPa)	0.53	0.59	0.59	0.60	0.60	0.58
平均出口压力(MPa)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.27	0.29
投料体积(L)	100	100	100	100	100	100
操作时间(min)	174	191	205	196	207	195
pH	3	3	3	3	3	3

1.4 膜的清洗 每批实验结束后要进行膜的清洗。清洗步骤如下:(1) 排出滤渣,用清水洗去系统残余的少量滤渣。(2) 用 pH 10 的 NaOH 溶液在 50℃ 下循环清洗 40 min 后排出清洗液。(3) 用质量分数为

收稿日期:2000-11-19

修回日期:2001-01-02

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(C9910003)

作者单位:1. 福建医科大学 药理学系化学教研室,福州 350004

2. 厦门大学三达膜科技有限公司,厦门 361006

3. 厦门大学化学材料科学系,厦门 361005

作者简介:李春艳(1965~),女,讲师

1%含酶清洗液在 50℃ 下循环清洗 45 min 后排出清洗液。(4)用清水洗至 pH 呈中性。

2 结果

2.1 滤液质量和过滤收率 取甲药厂的 1~5 批次头孢菌素 C 超滤液,分别测定滤液的蛋白质含量和过滤收率(此工作由厂方技术人员完成)。超滤后滤液中蛋白质平均含量由原工艺的 2%~3%降低到 0.2%~0.3%(仅为原工艺的 1/10),平均过滤收率由原工艺的 78%提高到 83.8%。随着滤液质量的提高,后工艺的提取收率也有较大提高,其中树脂提取收率由原工艺的 85%提高到 90%左右,结晶工序收率由原工艺的 82%提高到 85%左右。

2.2 超滤膜通量的影响因素 取乙药厂的头孢菌素 C 发酵液,酸化至 pH 3 后,用 Ultra-flo 超滤设备(进口压力为 0.6 MPa,出口压力为 0.3 MPa)超滤。超滤过程的膜通量随料液浓度、温度的变化情况见表 2。

2.3 超滤膜通量及其变化规律 甲药厂 1~5 批次的头孢菌素 C 发酵液超滤过程中膜通量随时间的变化曲线见图 2。

2.4 清洗恢复性 当膜通量突然衰减较多使过滤速度太慢时,说明膜由于吸附产生污染堵塞,此时要进行膜的清洗。为了考察清洗后膜的恢复性能,在甲药厂的 1~5 批次的超滤中试中,前 3 批采用已在多个不同产品中用过的旧膜,后 2 批换用新膜。新膜和旧膜的膜通量及其变化规律见图 2。

2.5 顶洗加水量

2.5.1 理论顶洗加水量 为了估算出顶洗加水量,笔者根据工业生产经验的数据总结出一个理论计算顶洗加水量的方法:假定初始料液体积 100 L,初始料液效价 20 000,料液中干渣质量分数 20%,首次加水前浓缩液与初始料液体积比 50%,首次加水前

浓缩液中滤渣质量分数 40%,膜对产物的透过效率 85%。依此方法,计算结果见表 3。

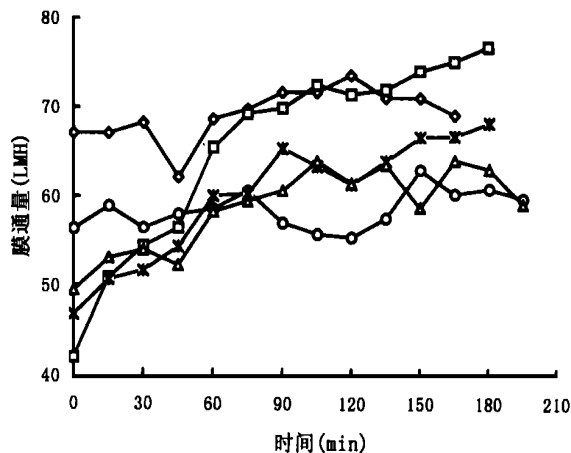


图 2 头孢菌素 C 发酵液超滤膜通量曲线
◇:1 批 □:2 批 ○:3 批 * :4 批 △:5 批

终止状态的浓缩液为要丢弃的滤渣,由干渣和滤液组成。因为此状态下,滤渣中滤液部分的产物理论损失率(%) = $(813 \times 30) \div (20\ 000 \times 80) = 1.52$,考虑到滤渣本身会吸附部分产物,滤渣实际损失率大约为 2%,说明洗涤已完全,洗涤过程的理论顶洗加水量为 180 L,为初始料液体积的 1.8 倍。

2.5.2 实际顶洗加水量 对甲药厂的 1~5 批次头孢菌素 C 发酵液超滤过程中实际顶洗加水量进行研究,结果见表 4。

3 讨论

近十余年来,超滤法作为一种新型的分离方法,在抗生素的提纯上得到了广泛的研究和应用^[2~5]。但其发酵液都要经严格预处理后才能进行超滤,否则超滤膜系统堵塞严重。笔者采用 Ultra-flo 超滤系统一步截留不经任何预处理的头孢菌素 C 发酵液中残留的菌丝体、蛋白质(包括可溶性蛋白)和悬浮微粒等杂质,简化了操作工艺流程,提高了滤液质量

表 2 膜通量随料液浓度、温度变化情况

时间 (min)	膜通量 (LMH)	温度 (℃)	滤出液体积 (L)	温度变化系数	料液浓度倍数变化	膜通量变化 (%)
0	45.4	17.5	0.0	1.00	1.00	100
10	39.4	18.0	9.0	1.03	1.10	87
20	37.2	17.5	17.0	1.00	1.20	82
30	37.0	17.5	25.0	1.00	1.33	81
40	38.4	18.0	32.0	1.03	1.47	85
50	39.9	18.5	38.0	1.06	1.61	88
60	40.6	19.0	44.0	1.09	1.79	89
70	39.9	20.0	52.0	1.14	2.08	88

表 3 顶洗加水量的理论计算

过滤操作	浓缩液部分					滤液部分	
	理论效价 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	总体积 (L)	液体体积 (L)	滤渣体积 (L)	加水体积 (L)	理论膜透过率 (%)	滤出液体积 (L)
加水前浓缩液*	22927	50	30	20			
初始料液	20000	100	80	20		85	50
加水后							
第1次	11463	80	60	20	30	85	30
第2次	6570	80	60	20	30	85	30
第3次	3766	80	60	20	30	85	30
第4次	2159	80	60	20	30	85	30
第5次	1237	80	60	20	30	85	30
第6次	709	80	60	20	30	85	30
终止状态	813	50	30	20	180		230

*: 加水前浓缩液理论效价 = 初始料液效价 \times (初始料液中液体体积 - 加水前滤出液体积 \times 透过效率/2) \div (浓缩液中液体体积 + 加水前滤出液体积 \times 透过效率/2)。

表 4 甲药厂头孢菌素 C 发酵液超滤中试的实际顶洗加水量

中试批次	投料体积 (L)	滤渣体积 (L)	加水前滤液 体积(L)	加水后滤液 体积(L)	滤液总体积 (L)	加水量 (L)	加水倍数	滤渣损失率 (%)
1	100	39	40	187	227	166	1.66	2.47
2	100	38	40	202	242	180	1.80	2.96
3	100	39	50	183	233	172	1.72	1.78
4	100	37	45	182	227	164	1.64	4.45
5	100	37	49	182	231	168	1.68	2.62
平均值	100	38	45	187	232	170	1.70	2.85

和产品收率。

超滤过程中, 料液的浓度和超滤的温度是影响膜通量的主要因素。料液浓度升高, 膜通量下降; 温度升高, 膜通量升高。因此在不使头孢菌素 C 发生热降解而降低过滤收率的前提下, 尽可能提高超滤温度, 使系统的膜通量较大。超滤过程的平均膜通量高达 66.3 LMH, 系统膜通量基本维持在 55~70 LMH 范围内(各批次的膜通量之间存在着一定的差异, 这主要是由于各批次的料液含固量、粘度、操作温度以及系统在操作结束后的清洗工作存在差异所致)。在超滤 195 min 后, 系统的膜通量仍未见衰减, 说明 Ultra-flo 超滤系统对不经任何预处理的头孢菌素 C 发酵液仍具有很强的处理能力。实际生产中料液总量大, 超滤过程料液浓度升高较慢, 膜通量衰减得就更为缓慢, 膜系统一般可以连续运行 >6 h。被污染的膜经清洗后与新膜在膜通量、膜通量变化及膜通量恢复三个方面, 没有明显差异, 说明 Ultra-flo 超滤系统的清洗恢复性能强。

实际的平均顶洗加水量倍数为 1.70, 与理论顶洗加水量倍数(1.8倍)相近, 说明笔者总结的理论

加水量计算方法对实际洗涤操作有一定的指导意义。在工业生产中, 影响顶洗加水量的因素很多, 其中料液的滤渣含量对加水量影响较大(各头孢菌素 C 厂家料液中滤渣含量不同)。滤渣含量较少, 加水量也较少, 其理论加水量也可依文中的方法计算, 但实际加水量一般比理论加水量略低些, 因为在膜系统安全运行(不堵塞)的前提下, 适当延迟加水时间可以使产品过滤较完全, 而加水时间的延迟可使加水量减少。

参考文献:

- [1] 顾觉奋, 李丽燕, 刘叶青, 等. 分离纯化工艺原理[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996. 256~261.
- [2] 周杏华, 傅桂华, 王树平, 等. 超过滤应用于麦迪霉素提炼的研究[J]. 医药工业, 1985, 16(10): 433~434.
- [3] 王树平. 超过滤技术提纯抗菌素的研究[J]. 膜科学与技术, 1988, 8(2): 6~10.
- [4] 李锡源, 梁宝林, 韩贵安. 超滤法在抗生素提炼中的应用[J]. 水处理技术, 1996, 22(4): 213.
- [5] 李十中, 王淀佐, 胡永平. 抗生素提取过程中溶剂萃取技术新方法—超滤/萃取法[J]. 中国抗生素杂志, 2000, 25(1): 12~15.

Application of Ultrafiltration for Purification of Cephalosporin C

LI Chun-Yan¹, FANG Fu-Lin², HE Xu-Min³, et al

(1. Division of Medicine, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

2. Xiamen University Sundar Membrane Sci-technology Co. Ltd, Xiamen 361005, China

3. Division of Materials Science and Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT: Objective To investigate a method to purify the fermentation liquor of cephalosporin C in order to increase the quality of filter liquor and filtering yield, and to simplify the processes.

Methods The Ultra-flo membrane system was used to purify cephalosporin C fermentation liquor without any pretreatment. **Results** The protein content in the filtrate was only 1/10 that of the original process; the average filtering yield was 83.8%, with a 4%~5% increasing; the average flux was as high as 66.3 LMH. The membrane system could run steadily for a long time. There was no significant difference between new and contaminated membrane after clearing. The calculated quantity of water used in filtering is 1.8 times as much as that of the original feed. **Conclusion** The Ultra-flo membrane system can be used to replace the original process in the purification of cephalosporin C fermentation liquor, the calculated quantity of water can be applied to wash the filter residue.

KEY WORDS: cephalosporin C; ultrafiltration; separation and purification

2000 年研究生毕业论文摘要

动态观察直肠癌旁移行粘膜 p53, p21^{ras} 蛋白表达及细胞增殖动力学变化与吻合口复发的关系

硕士研究生 胡天明

专业 外科学(普通外科)

导师 池畔副教授, 陈大良、殷凤峙教授

目的 探讨直肠癌旁移行粘膜的性质及其与术后吻合口癌肿复发的关系。 **方法** 应用粘液组织化学、免疫组织化学技术和图像细胞光度计(ICM)对67例直肠癌手术切除标本及其近、远端肠管粘膜及33例术后1年、31例术后2年以上直肠粘膜病理活检标本(吻合口至其下3cm)同步检测其 p21^{ras}、p53 蛋白表达率,增殖细胞核抗原(PCNA)指数及 DNA 含量和倍体变化。 **结果** (1)高铁二胺-阿辛蓝(HID-AB, pH 2.5)染色:近切端中无Ⅱ级以上唾液酸粘蛋白反应,癌组织中Ⅱ级以上唾液酸粘蛋白反应占53.7%,远切端 TM 阳性率为14.9%,高于近切端($P < 0.01$),术后复查 TM 阳性率与远切端相比增高(1年为39.4%,2年以上为32.3%, $P < 0.001$)。 (2) p21^{ras} 蛋白表达:近切端粘膜无 p21^{ras} 蛋白表达,癌组织为61.2%,远切端(13.4%)高于近切端($P < 0.01$),但在远切端正常粘膜和 TM 中表达无差异($P > 0.05$),术后复查与远切端相比有下降趋势(术后1年9.1%,2年以上3.2%, $P < 0.05$)。 (3) p53 蛋白表达:近切端粘膜无 p53 蛋白表达,癌组织为59.7%,远切端(7.5%)高于近切端,但统计学意义不显著($P > 0.05$),术后复查与远

切端相比阳性率降低,1年为6.1%,2年以上为0(0/31), p53 蛋白表达在远切端正常粘膜和 TM 中差异无显著性($P > 0.05$)。 (4) PCNA 指数:癌组织 PCNA 指数显著升高(与近切端相比, $P < 0.001$),远切端 PCNA 指数高于近切端($P < 0.01$),但在其正常粘膜和 TM 中差异无显著性($P > 0.05$),术后1年及2年以上复查病例 PCNA 指数与远切端相比降低($P < 0.01$)。 (5) DNA 质量和倍体:癌组织 DNA 平均质量显著增高,异倍体增多(与近切端比, $P < 0.01$),远切端 DNA 平均质量也增高(与近切端比, $P < 0.05$),但在其正常粘膜和 TM 中差异无显著性($P > 0.05$),术后1年及2年以上复查病例 DNA 质量与远切端相比降低($P < 0.05$)。

结论 直肠癌旁移行粘膜是一种继发的非特异性改变,而不是原发性癌前病变,其存在与否和直肠癌根治术后吻合口癌肿复发无关。

关键词 直肠肿瘤;移行粘膜; p53 蛋白; p21^{ras}; 增殖动力学; 肿瘤复发

(现在哈尔滨医科大学附属第二医院)