

文章编号:1009-038X(2004)06-0051-04

头孢唑林钠在吐温 80-硫酸钠液-固萃取体系中的分配行为

邹群, 邹干朋, 张迎庆

(湖北工业大学生物工程学院, 湖北 武汉 430068)

摘要: 对头孢菌素类抗生素——头孢唑林钠在吐温 80-硫酸钠液-固萃取体系中的分配行为做了初步研究. 试验了成相聚合物吐温 80 的体积分数、成相盐硫酸钠的浓度和体系 pH 值对头孢唑林钠在吐温 80 固相中正萃取的影响; 硫酸钠浓度对头孢唑林钠在硫酸钠盐水相中反萃取的影响. 结果表明: 吐温 80 在体系中体积分数为 12%, 硫酸钠浓度为 1.48 mol/L, pH 5.0 时, 吐温 80 固相对头孢唑林钠的正萃取率为 72.0%; 正萃取后, 收集并溶解吐温 80 固相, 调节二次成相硫酸钠浓度为 0.53 mol/L, pH 9.0, 硫酸钠盐水相对头孢唑林钠的反萃取率为 70%. 结果表明, 头孢唑林钠在该体系中有较高的萃取率和较好的稳定性.

关键词: 吐温 80; 液-固萃取; 头孢唑林钠

中图分类号: TQ 028.3

文献标识码: A

Primary Study on the Partition of Cephalosrins in Tween80- Na_2SO_4 Liquid-Solid Extraction System

ZOU Qun, ZOU Gan-peng, ZHANG Ying-qing

(School of Bioengineering, Hubei Polytechnic University, Wuhan 430068, China)

Abstract: The distribution of small biomolecular, cefrazolin sodium, in the polymer-salt aqueous liquid-solid extraction system, Tween80- Na_2SO_4 system, was investigated. Some parameters contributed to the partitioning behavior of cephalosporins, such as the concentration of the phase-forming polymer, Tween80, the phase-forming salt, Na_2SO_4 and the pH of the system were studied. The optimal conditions were obtained. Under the optimal condition, where the concentration of Tween80 was 12% (volume fraction), Na_2SO_4 was 1.48 mol/L, and pH 5.0, the recovery of cefrazolin sodium in Tween80 phase was 73%. With the concentration of phase-forming salt, Na_2SO_4 , adjusted to 0.53 mol/L at pH 9.0, the dissolved Tween80 reformed the liquid-solid two phase system, and the cefrazolin sodium was extracted to the salt aqueous with the recovery near 70%. From the result, it is concluded that, the polymer-salt liquid-solid extraction system could be applied for the partitioning of small biomoleculars such as cephalosporins with satisfied recovery and imperceptible damages to the bioactivities of the biomoleculars.

Key words: Tween80; liquid-solid extraction; cefrazolin sodium

收稿日期: 2004-03-16; 修回日期: 2004-05-09.

作者简介: 邹群(1965-), 男, 湖北武汉人, 天然药物博士研究生.

溶剂萃取技术在制药工业中,特别是在抗生素分离提取中已有广泛的应用^[1~3].传统抗生素如青霉素、红霉素、麦迪霉素、林可霉素等数十种抗生素都可采用溶剂萃取法分离.溶剂萃取在抗生素提取中的应用主要在两方面:一是用于发酵产品的纯化;二是中间体的分离、提取.许多传统的高效、广谱抗生素的溶剂萃取分离在萃取新机制、新工艺方面得到深入研究,如青霉素的溶剂萃取,从传统的醋酸丁酯萃取开发出了胺类萃取体系、中性腈类萃取体系、亚砷类萃取体系等^[4];传统大环内酯类抗生素红霉素、乙酰螺旋霉素、麦迪霉素的溶剂萃取,由传统的乙酸丁酯萃取开发了中性络合萃取体系、协同萃取体系等^[5~7].随着现代分离技术的发展,双水相萃取、反胶束萃取、超滤-萃取组合技术也成功地应用于抗生素分离^[4,8].尽管溶剂萃取技术已很成熟,但经验表明,溶剂萃取一次转移并不能将杂质充分除去,需采用多级萃取,工艺路线复杂,能耗高,溶剂消耗大,且抗生素在漫长的提取过程中容易变性失活^[9].因而开发新的萃取体系用于抗生素的分离,仍具有很大意义.近年来双水相萃取技术应用于生物小分子抗生素的分离提取获得了很大进展^[10,11].但由于形成双水相的聚合物如聚乙二醇等试剂价格昂贵,且回收复用困难,导致生产成本过高,因而阻碍了该技术在工业上的实际应用^[9].

聚合物-盐液-固萃取体系是新近开发的萃取体系,已应用于生物大分子的分离纯化并获得成功.与传统有机溶剂萃取体系相比,该体系不使用有机溶剂,无毒、安全,使用聚合物如聚乙烯吡咯酮、吐温80等价廉易得.该体系与双水相体系相比,还表现为聚合物相(固)-盐水相(液)分相彻底,两相界面无乳化,不存在蛋白质的界面吸附滞留,生物物质分配更完全,以及两相分离操作简单,聚合物回收方便等优势^[12,13].作者利用吐温80-硫酸钠液-固萃取体系对头孢菌素类抗生素生物小分子头孢唑啉钠进行分离提取试验,探讨该体系应用于生物小分子分离的可行性.

头孢唑啉钠结构见图1.

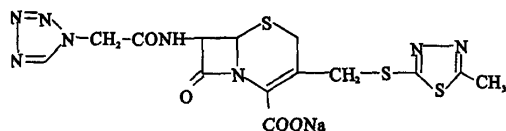


图1 头孢唑啉钠结构

Fig.1 The structure of Cefazolin Sodium

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

注射用头孢唑啉钠:华北制药集团生产,批号021130;吐温80:药用级,上海大众制药厂生产;无水硫酸钠、磷钼酸:分析纯,天津化学试剂公司生产;其他试剂均为国产分析纯;使用二次蒸馏水.

WH-3旋涡混合仪:上海沪西分析仪器厂制造;TGL-16C高速离心机:上海安亭科学仪器厂制造;AR1530电子天平:美国奥豪斯公司制造;PHS-3C精密酸度计:上海雷磁仪器厂生产;UV-2400紫外可见分光光度计:日本岛津公司生产.

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程(单级萃取)

抗生素+吐温80/硫酸钠分相萃取→

吐温80固相(头孢唑啉)→溶解→加入硫酸钠二次
分相反萃取→ $\begin{cases} \text{吐温80固相} \\ \text{硫酸钠盐水相(头孢唑啉)} \end{cases}$
硫酸钠盐水相

1.2.2 头孢唑啉钠的正萃取 在25 mL具塞比色管中,加入计量的无水硫酸钠固体,使体系中硫酸钠浓度为0.95~1.48 mol/L,加二次蒸馏水适量,置旋涡混合仪上混合至盐溶解,同时以适量的浓度为1 mol/L HCl或1 mol/L NaOH调节体系pH值;加入计量的吐温80贮备液,使体系中吐温80体积分数为8%~12%;然后加入计量体积的头孢唑啉钠溶液,使头孢唑啉钠在体系中质量浓度为2.0 mg/mL,最终以二次蒸馏水定容至萃取体系总体积为10 mL.置旋涡混合仪上混匀5 min,取下倒置15 min,体系完全分为吐温80固相和硫酸钠盐水相.

完全倾出盐水相,以二次蒸馏水定容至10 mL,取一定体积测定盐水相中头孢唑啉钠质量浓度.每只试验管均做一空白管和一对照管.空白管是在分离前后均不加入头孢唑啉钠溶液,用于测定头孢唑啉钠质量浓度时作测定空白;对照管则是在一次分相后的盐水相中,加入与正萃取分相前同体积的头孢唑啉钠溶液,用于测定未分离的头孢唑啉钠总质量浓度,由此计算盐水相对头孢唑啉钠的萃取率.

1.2.3 头孢唑啉钠的反萃取 取正萃取后的吐温80固相,以适量二次蒸馏水溶解吐温80至完全,以二次蒸馏水定容至10 mL;同时以1 mol/L HCl或1 mol/L NaOH调节体系pH值,加入计量的无水硫酸钠固体,按1.2.2操作分相.

二次分相完毕后倾出盐水相,以二次蒸馏水定容至10 mL,取一定体积测定反萃入盐水相的头孢

唑啉钠质量浓度。

1.2.4 头孢唑啉钠质量浓度的测定 用磷钼酸比色法测定头孢唑啉钠质量浓度。磷钼酸作氧化剂与头孢唑啉钠加热反应后,产生的蓝色产物在 700 nm 波长处在较长时间有稳定的最大吸收,在一定浓度范围,最大吸收值与其浓度符合朗伯-比耳定律,可用于 7 种头孢抗生素原料药和制剂的分析^[14]。

取 1.0 mol/L H_2SO_4 和 1% 磷钼酸各 5 mL,加入 25 mL 试管中混匀,加入计量体积的待测头孢唑啉钠质量浓度的硫酸钠盐水相溶液,加二次蒸馏水使终体积为 24 mL,混匀后,置 $(98 \pm 0.5)^\circ C$ 水浴中加热 25 min,然后迅速冷却至室温,溶液转入 25 mL 容量瓶,以二次蒸馏水定容至刻度,取适当体积溶液,5 000 r/min 离心 5 min,测定离心液在 700 nm 的光吸收值。以同法处理的空白溶液做测定空白。同法测定对照管硫酸钠盐水相头孢唑啉钠的光吸收值。

1.2.5 头孢唑啉钠萃取率的计算 根据朗伯-比耳定律,试验管盐水相中头孢唑啉钠光吸收值与头孢唑啉钠质量浓度关系为:

$$A_{ex} = E \cdot L \cdot C_{ex}$$

对照管盐水相中头孢唑啉钠光吸收值与头孢唑啉钠质量浓度关系为:

$$A_{ad} = E \cdot L \cdot C_{ad}$$

则盐水相中头孢唑啉钠萃取率 E' :

$$E' = C_{ex} / C_{ad} = A_{ex} / A_{ad}$$

吐温 80 固相溶解后,由于受高体积分数的表面活性剂吐温 80 的影响,吐温 80 固相中头孢唑啉钠光吸收值与头孢唑啉钠质量浓度不符合朗伯-比耳定律,因此,定义吐温 80 固相中头孢唑啉钠萃取率 E :

$$E = 1 - A_{ex} / A_{ad}$$

2 结果与讨论

2.1 吐温 80 体积分数对头孢唑啉钠萃取的影响

在吐温 80-硫酸钠液-固萃取体系中,随着成相聚合物吐温 80 的体积分数增大,即吐温 80 在体系中体积分数为 8%~12%,吐温 80 固相对头孢唑啉钠的萃取呈增大趋势(见图 2),这种情况在低硫酸钠浓度时更为明显。

2.2 硫酸钠浓度对头孢唑啉钠萃取的影响

从图 2 看到,对一定体积分数的吐温 80 体系,随着成相硫酸钠浓度的增大,吐温 80 固相对头孢唑啉钠萃取率增大,在硫酸钠浓度为 1.48 mol/L 时,可达到最大萃取率。该趋势与已报道的吐温 80-

盐液-固萃取体系对生物大分子的萃取结果一致^[13]。

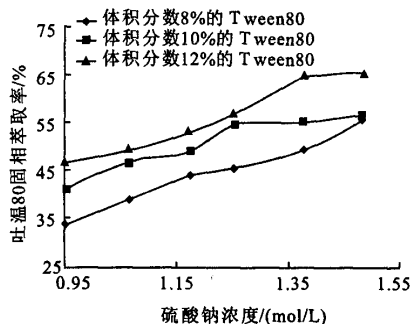


图 2 头孢唑啉钠萃取率与硫酸钠浓度关系

Fig. 2 The relationship of the recovery of Cefazolin Sodium in the Tween80 phase with the concentration of Na_2SO_4

为了提高头孢唑啉钠的萃取率,可继续增大硫酸钠浓度。但实际分离操作中,硫酸钠浓度继续增大受到两种因素的限制:一是分离浓度下硫酸钠的溶解度;二是硫酸钠浓度增大导致体系离子增大对抗生素活性的影响,因而实际分离操作中不能继续增大硫酸钠的浓度。

2.3 体系 pH 值对头孢唑啉钠萃取的影响

选择成相硫酸钠浓度 1.48 mol/L,并以 1.0 mol/L HCl 或 1.0 mol/L NaOH 调节体系 pH 值。分相后分别测定盐水相的 pH 值,得出体系 pH 值对头孢唑啉钠萃取率的影响,见图 3。

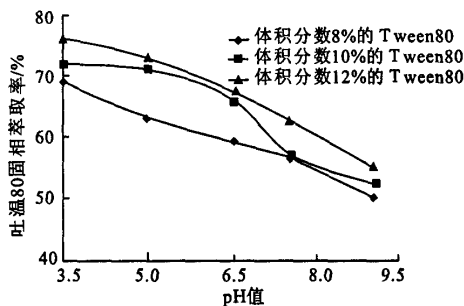


图 3 头孢唑啉钠萃取率与体系 pH 值关系

Fig. 3 The relationship of the recovery of Cefazolin Sodium in the Tween80 phase with the pH of the extraction system

从图 3 可以看到,随着萃取体系 pH 值的增大(pH 3.5~9.5),吐温 80 固相对头孢唑啉钠萃取率急剧下降,在 pH 3.5 时有最大萃取率。考虑到头孢唑啉钠的稳定性,实际工作中可选择 pH 5.0。

虽然吐温 80 与被萃取化合物作用的萃取机制尚不明确,但对无机大分子的萃取表明,吐温 80 与被萃取物作用是氢键型缔合作用^[8]。对于头孢唑啉

(游离酸)pK_a 2.5, 显然在低 pH 值条件下, 头孢唑林钠应以头孢唑啉(游离酸)分子型体存在为主, 此时头孢唑啉分子中富含 N 原子的芳杂环和酰氨基结构与吐温 80 分子中聚氧乙烯结构具更强的化学作用, 从而在低 pH 值条件下, 吐温 80 固相对头孢唑林钠有更高的萃取率. 这个试验结果进一步表明吐温 80 与被萃取物的萃取机制更似分子缔合萃取.

实际分离中, 对头孢唑林钠的萃取不宜再降低溶液 pH 值, 因为在更低 pH 值条件下, 头孢抗生素头孢唑林钠的稳定性差.

2.4 头孢唑林钠的反萃取

头孢唑林钠的反萃取试验目的有两个: 一是萃取操作的需要, 需将头孢唑林钠与聚合物相分离, 以利于抗生素的后续分离; 二是通过检测最佳反萃取条件下, 反萃取入盐水相的头孢唑林钠质量浓度与对照组头孢唑林钠质量浓度的比较, 以判断该体系对抗生素活性在萃取过程中的保护作用.

根据正萃取条件, 可以设计出与正萃取相应的反萃取条件, 即能满足二次分相的尽可能低的盐浓度, 以及不利于正萃取的 pH 值条件.

头孢唑林钠正萃取条件吐温 80 体积分数 12%, 硫酸钠浓度 1.48 mol/L, pH 5.0, 反萃取经试验则选择 pH 9.0, 硫酸钠浓度 0.53 mol/L, 结果见表 1.

结合表 1 和图 2, 3 分析, 由于头孢唑林钠在正萃取条件下(pH 5.0), 分配到吐温 80 固相的头孢唑林与吐温 80 存在较强的化学缔合作用, 欲使头

孢唑林钠在反萃取中萃入硫酸钠盐水相, 则需很低的二次分相的硫酸钠浓度和很高的体系 pH 值, 而在反萃取条件下, 由于为了满足二次成相条件, 不能继续降低硫酸钠浓度, 考虑到抗生素的稳定性, 不宜继续增大体系 pH 值, 故硫酸钠盐水相中头孢唑林钠的反萃取率较低. 虽然头孢唑林钠的反萃取率低于 100%, 但不能认为头孢唑林钠在体系中显著失活, 因为试验其他头孢类抗生素可证实不存在失活现象, 头孢唑林钠的反萃取率较低与萃取机制有关.

表 1 头孢唑林钠反萃取试验结果

Tab. 1 The results of the re-extraction of Cefazolin Sodium in the salt aqueous system

试验号	正萃取 A_{ex}/A_{ed}	正萃取 $(1-A_{ex}/A_{ed})$	反萃取 (A_{ex}/A_{ed})	反萃取率/%
1	0.269	0.731	0.509	69.6
2	0.291	0.709	0.510	71.9
3	0.283	0.717	0.510	71.1

3 结 论

使用吐温 80-硫酸钠液-固萃取体系进行了头孢唑林钠的萃取试验. 结果表明, 萃取操作可在适宜 pH 值(pH 5.0~9.0)条件下进行; 操作可在室温下进行; 吐温 80 固相与硫酸钠盐水相分相彻底, 没有界面乳化问题; 吐温 80 回收简单易行; 该体系对头孢唑林钠单级萃取具有较高的萃取率; 头孢唑林钠在该体系中没有变性失活问题.

参考文献:

- [1] Ridyway K, Thorpe E E. Handbook of Solvent Extraction[M]. New York: Wiley-Interscience, 1983. 583—593.
- [2] Verrail M S. Science and Practice of Liquid-Liquid Extraction[M]. Oxford: Science Replications, 1992. 194—212.
- [3] Yong M M. Comprehensive Biotechnology[M]. New York: Pergaman Press, 1985. 439—445.
- [4] 苗勇, 元平言, 周侧. 青霉素提纯工艺生产现状和研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 1999, 30(9): 421—426.
- [5] 李洲, 秦峰, 谷雪蕾. 红霉素萃取新工艺研究-中性络合萃取体系研究[J]. 中国抗生素杂志, 2000, 25(3): 167—171.
- [6] 李洲, 王进. 大环内酯类抗生素的中性络合萃取体系研究[J]. 中国医药工业杂志, 1997, 28(2): 440—445.
- [7] 李洲, 杜立鸣. 螺旋霉素的协同萃取研究[J]. 中国医药工业杂志, 2001, 32(4): 147—149.
- [8] 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.
- [9] 崔秉懿, 元平言. 溶剂萃取技术在抗生素提取中的应用和发展[J]. 国外医药抗生素分册, 2000, 21(5): 215—217, 221.
- [10] Yang W Y, Lin C D, Lec C J. Extraction of Cephalosporin C from whole broth and separation of desacetyl Cephalosporin C by aqueous two-phase partition [J]. Biotechnol Bioeng, 1994, 43: 439—445.
- [11] Lee C K, Sandler S I. Vancomycin partitioning in aqueous two-phase system: effect of pH, salts and an affinity ligand [J]. Biotechnol Bioeng, 1990, 35: 408—413.
- [12] 李步海, 邹群, 孙小梅. 聚合物-盐水液-固萃取新体系的研究现状与前景[J]. 分析化学, 1998, 26(8): 1022—1028.
- [13] 邹群, 孙小梅, 李步海. 用三噻染科配基吐温 80-磷酸盐液-固萃取体系分离纯化乳酸脱氢酶[J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(4): 339—343.
- [14] Josopoulos P B. 利用磷钼酸比色法测定七种头孢菌素的分光光度法[J]. 国外医学药学分册, 1989, 16(3): 189—192.

(责任编辑: 李春丽)