



УДК 544.726.3

## Сорбционное разделение продуктов энзиматического гидролиза при получении 6-аминопенициллановой кислоты

Ефименко Н.В., Котова Н.В., Глазова Н.В.

ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 23.04.2013 г.

### Аннотация

Проведено исследование сорбции компонентов смеси, образующейся при энзиматическом гидролизе калиевой соли бензилпенициллина, на различных сорбентах. Получены равновесные и кинетические характеристики процесса и на их основании проведен кинетико-динамический анализ процесса сорбции. Подобраны оптимальные условия разделения смеси компонентов на сорбенте С-160 с целью выделения фенилуксусной кислоты (ФУК), как ценного реактива с возможностью его последующего использования.

**Ключевые слова:** сорбция, фенилуксусная кислота, 6-аминопенициллановая кислота

The study of sorption of mixture components which formed by enzymatic hydrolysis of the potassium salt of benzylpenicillin, was held on various sorbents. Equilibrium and kinetic characteristics of the process were obtained and on their basis kinetic-dynamic analysis of the sorption process was performed. Optimal conditions were selected for separating a mixture of components on the sorbent C-160 in order to isolate phenylacetic acid as a valuable reagent with the ability to use in the future.

**Keywords:** sorption, phenylacetic acid, 6-aminopenicillanic acid

### Введение

С учетом современных экологических требований и по мере развития производства с его масштабностью и темпами роста все большую актуальность приобретают проблемы разработки и внедрения мало- и безотходных технологий.

Существует возможность создания малоотходной технологии при производстве 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК) путем энзиматического гидролиза технической калиевой соли бензилпенициллина. В настоящее время, общий выход целевого продукта составляет около 60%, остальные 40% являются отходами, в которых содержится: бензилпенициллин, 6-АПК и ФУК, которая является продуктом реакции гидролиза бензилпенициллина. ФУК является ценным реактивом для различных химических реакций, например, в процессе биосинтеза бензилпенициллина, в качестве предшественника. ФУК является исходным продуктом для синтеза фенамина, лекарственного препарата из группы стимуляторов нервной деятельности.

В настоящее время сорбционно-хроматографические методы в силу своей технологической гибкости стали наиболее эффективными методами выделения и

очистки БАВ, особенно при использовании сорбентов нового поколения. Таким образом, целью данного исследования стала разработка сорбционно-хроматографического метода выделения ФУК из продуктов ферментативного гидролиза при получении 6-АПК.

Практическая значимость представленного исследования заключается в возможности создания и внедрения малоотходной технологии получения 6-АПК, за счет выделения ценного реактива (ФУК) из отходов производства и возвращения его в производственный цикл.

## Эксперимент

Объектами исследования являлись модельные растворы калиевой соли бензилпенициллина, 6-АПК, ФУК и смесь этих компонентов в пропорциях близких к реальным условиям при гидролизе. Основные свойства этих веществ представлены в таблице 1.

Таблица 1. Физико-химические свойства исследуемых веществ

Вещество	Молярная масса, г/моль	pK
Бензилпенициллин	372.5	2.75
6-АПК	216	карбоксильной группы – 2.6 аминогруппы – 4.65 изоэлектрическая точка pI=3.63
ФУК	136.15	4.31

Для исследования были выбраны макропористые и изопористые ионогенные и неионогенные сорбенты. Молекулярные носители – Полисорб (ПС) и сорбент нового поколения Стиросорб Ст4; ионогенные сорбенты – сульфокатиониты Стиросорб Ст5, Пьюролайт С-150 и сильнокислотный сульфокатионит Пьюролайт С-160. Дополнительно проведена модификация молекулярного сорбента Полисорб Катамином АБ с целью получения ионогенного сорбента – анионита ПС<sup>+</sup> [1].

Данные сорбенты обладают особыми свойствами, связанными с нетрадиционным способом синтеза этих полимеров. Отличительными особенностями, определяемыми структурой, являются высокая физико-механическая и осмотическая стабильность, незначительные объемные изменения. Равномерный характер распределения сшивок в матрице сорбентов предопределяет хорошую кинетику ионного обмена, в связи с улучшенной диффузией ионов внутри зерна ионита [2]. Характеристика используемых сорбентов приведена в табл.2.

Таблица 2. Характеристики сорбентов, используемых в работе

Сорбент	Насыпной вес, г/мл	Средний радиус зерна сорбента, мм	Тип матрицы	Функциональные группы	Коэффициент набухания
1	2	3	4	5	6
Полисорб ПС	0.295-0.310	0.4-0.6	Полистирольная макропористая	–	1.3
модифицированный Полисорб ПС <sup>+</sup>	0.355-0.375	0.4-0.6		аминогруппы, анионит	1.2

1	2	3	4	5	6
Стирсорб Ст4	0.425-0.475	0.5-2	Полистирольная Макро-сетчатая (изопо-ристая)	–	1.3
Стирсорб Ст5	0.450-0.490	0.5-2		сульфокатионит	1.6
Пьюролайт С-150	0.785-0.825	0.45-1.2	Полистирольная макро-пористая	сульфокатионит	1.8
Пьюролайт С-160	0.820-0.860	0.45-1.2		сульфокатионит	1.4

Концентрации бензилпенициллина, 6-АПК и ФУК в модельных растворах определяли спектрофотометрически при длине волны  $\lambda=262,5$  нм. Концентрацию бензилпенициллина в смеси определяли йодометрическим титрованием [3], концентрацию ФУК в смеси – по методике, описанной в [4].

### Обсуждение результатов

На начальном этапе исследования изучены процессы сорбции бензилпенициллина, 6-АПК и ФУК из модельных растворов на различных носителях при варьировании рН и концентрации сорбента. В результате подобраны условия проведения дальнейших экспериментов: рН=4,0, концентрация сорбента  $2,0\pm 0,2$  мг/мл.

Для оптимизации процесса сорбции с использованием кинетико-динамического анализа необходимо знать как равновесные ( $K_d$ ) так и кинетические ( $D$ ) параметры. Для определения коэффициента распределения ( $K_d$ ) исследовали изотермический процесс сорбции ( $t=21^\circ\text{C}$ ) в статических условиях на различных сорбентах [5]. На рис. 1-3 представлены изотермы, полученные на сорбентах: Полисорб, модифицированный Полисорб, сульфокатионит С-160.

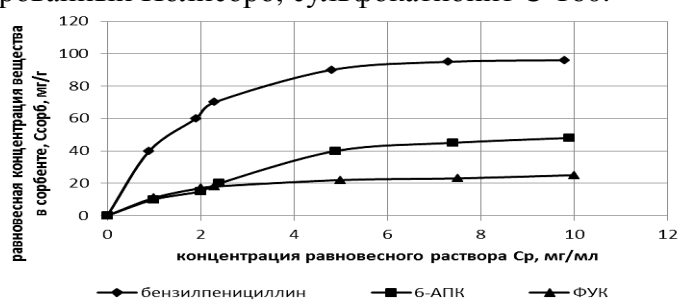


Рис. 1. Изотермы сорбции бензилпенициллина, 6-АПК и ФУК на сорбенте ПС

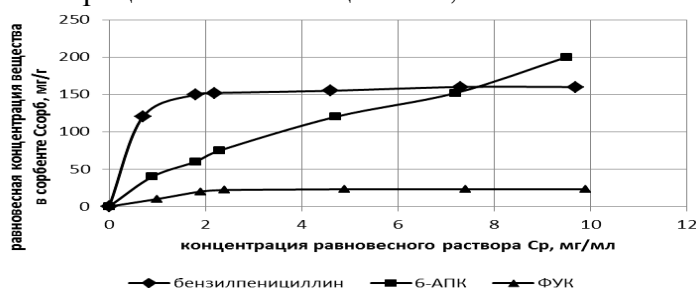


Рис. 2. Изотермы сорбции бензилпенициллина, 6-АПК и ФУК на модифицированном сорбенте ПС<sup>+</sup>

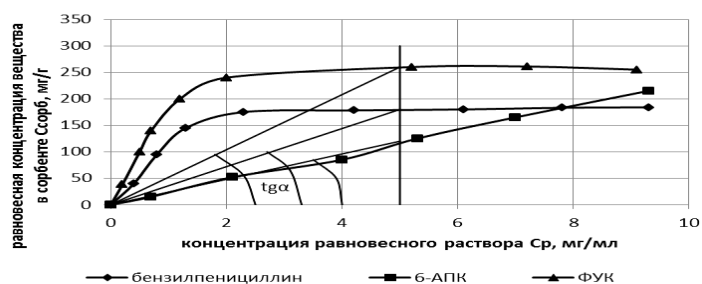


Рис. 3. Изотермы сорбции бензилпенициллина, 6-АПК и ФУК на сорбенте С-160

В табл. 3 представлены данные графического расчета коэффициентов распределения вещества между фазой сорбента и раствором ( $K_d$ , мл/г) при соответствующей концентрации исследуемого вещества 5 мг/мл.

Таблица 3. Значения коэффициентов распределения вещества между фазой сорбента и раствором бензилпенициллина, 6-АПК и ФУК

Сорбент	$K_d$ , мл/г		
	Бензилпенициллин	6-АПК	ФУК
ПС	18	7	4
ПС+	31	24	5
Ст4	24	19	25
Ст5	21	28	32
С-150	20	27	39
С-160	36	23	52

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что процесс сорбции ФУК протекает с максимальной избирательностью на сульфокатионитах Ст5, С-150 и С-160. Об этом свидетельствуют высокие значения коэффициентов распределения. Максимальная избирательность процесса сорбции бензилпенициллина достигается на модифицированном сорбенте Полисорб (ПС+).

С помощью методов «прерывания контакта фаз» и построения кинетической кривой [6] показано, что лимитирующей стадией процесса сорбции исследуемых веществ является внутридиффузионная кинетика. В соответствии с этим коэффициенты диффузии находили с помощью уравнения Паттерсона [7] и графически: по наклону начального прямолинейного участка зависимости  $F=f(\sqrt{t})$ . Для этого рассчитана степень завершенности процесса  $F$  и построены зависимости  $F=f(\sqrt{t})$  (на рис.4 представлены кинетические кривые сорбции ФУК).

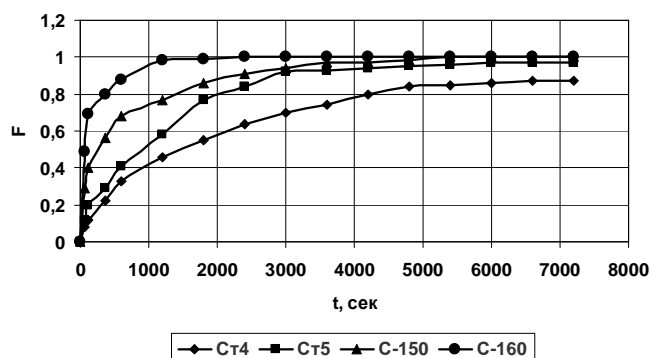


Рис. 4. Кинетические кривые сорбции ФУК на различных сорбентах

Графическим методом определили среднее время сорбции  $t_{cp}$ , как площадь над кинетической кривой. Рассчитанные коэффициенты диффузии и среднее время сорбции  $t_{cp}$  представлены в табл. 4.

Исследование кинетики процесса сорбции бензилпенициллина, 6-АПК и ФУК показало, что расчетные и графические значения коэффициентов диффузии сопоставимы. Эффективные коэффициенты диффузии на сульфокатионитах С-150 и С-160 при сорбции ФУК на порядок выше, чем на остальных сорбентах, и составили:  $(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$ ,  $(2,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$ , что соответственно говорит о высокой скорости диффузионного процесса. Это также подтверждают и малые значения среднего времени сорбции (табл.4).

Таблица 4. Значения коэффициентов диффузии и среднее время сорбции исследуемых веществ.

Вещество	Сорбент	$t_{cp}$ ,сек	$D$ , м <sup>2</sup> /сек (графич)	$D$ , м <sup>2</sup> /сек (расч)
Pen G	ПС	1300	$(3,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$	$(4,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$
	ПС+	460	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-11}$	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-11}$
	Ст4	970	$(4,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$	$(6,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$
	Ст5	2800	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$	$(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$
	С-150	1460	$(2,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-12}$	$(4,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-12}$
	С-160	1540	$(3,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-12}$	$(3,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-12}$
6-АПК	ПС	6900	$(9,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-13}$	$(8,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-13}$
	ПС+	330	$(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$	$(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$
	Ст4	360	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-12}$	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-12}$
	Ст5	1460	$(4,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-12}$	$(4,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-12}$
	С-150	2500	$(2,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$	$(2,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$
	С-160	970	$(5,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-12}$	$(6,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-12}$
ФУК	Ст4	4000	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$
	Ст5	2300	$(2,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-12}$	$(2,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-12}$
	С-150	320	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$	$(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$
	С-160	210	$(2,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$	$(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$

Эффективность ионообменных процессов выделения и очистки веществ зависит от условий проведения динамического процесса: скорости пропускания раствора через колонку, оптимального зернения сорбента, высоты насыпного слоя сорбента, элюента и диаметра колонки. Зная эти параметры, можно провести кинетико-динамический анализ процесса сорбции.

Эксперименты в статических условиях на модельных растворах исследуемых веществ и их кинетический анализ определили условия эффективного проведения процесса сорбции в динамических условиях. Были выбраны сорбенты, имеющие наилучшие кинетические и равновесные параметры.

Исследование динамического процесса сорбции ФУК проводилось на сульфокатионите С-160 с различными скоростями пропускания раствора в колонке  $d \times H = (0,6 \times 5) \text{ см}$  (рис. 5).

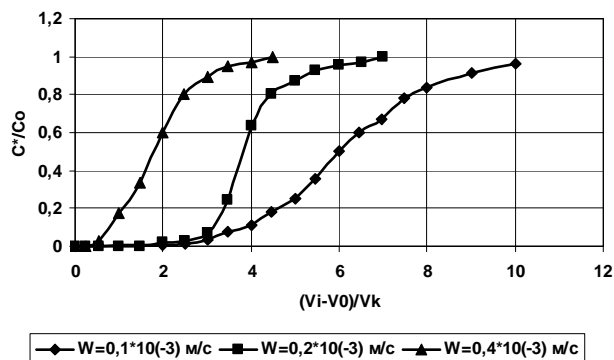


Рис. 5. Выходные кривые сорбции ФУК на сульфокатионите С-160 с различными скоростями

Показано, что при сорбции ФУК наблюдается значительная зависимость величины емкости сорбции и времени проскока от скорости проведения процесса. При этом при скорости пропускания раствора  $W=0,2 \cdot 10^{-3}$  м/с достигается регулярный режим.

Для оценки режима неравновесного процесса использовали теоретический критерий регулярности режима сорбции  $\lambda$ , который учитывает влияние как равновесного ( $K_d$ ), так и кинетического ( $D$ ) фактора, а также влияние условий проведения динамического процесса сорбции (скорость подвижной фазы, высота слоя сорбента).

Для оптимального кинетико-динамического анализа процесса сорбции исследуемых веществ произведен теоретический расчет критериального параметра  $\lambda$  [8]. Показано, что для всех объектов исследования параметр  $\lambda$  уменьшается с увеличением скорости ведения процесса и соответственно не достигается регулярный режим ( $\lambda < 1$ ). Максимальные значения  $\lambda$  при сорбции ФУК получены на сульфокатионите С-160 ( $\lambda=9,05$ , при  $W=0,1 \cdot 10^{-3}$  м/с). При этом для бензилпенициллина и 6-АПК наблюдается нерегулярный режим, что дает возможность эффективного выделения ФУК из смеси.

Кинетико-динамические параметры сорбции бензилпенициллина, 6-АПК и ФУК представлены в табл. 5.

На заключительном этапе исследования проводили изучение процесса сорбции бензилпенициллина и ФУК из модельной смеси в динамических условиях на сорбенте С-160 в колонке  $d \times H = (0,6 \times 5)$  см.

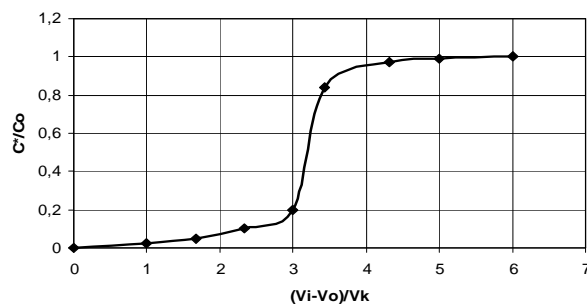


Рис. 6. Выходная кривая сорбции ФУК на сорбенте С-160, при скорости пропускания раствора  $W=0,2 \cdot 10^{-3}$  м/с

Выходная кривая сорбции ФУК из смеси при скорости пропускания раствора  $W=0,2 \cdot 10^{-3}$  м/с (рис. 6) имеет вид симметричной кривой, что говорит о регулярности процесса сорбции и высокой емкости (площадь над выходной кривой). Установлено,

что 6-АПК и бензилпенициллин остаются в проскоке и не влияют на процесс сорбции.

Таблица 5. Кинетико-динамические параметры сорбции исследуемых веществ на различных сорбентах

Бензилпенициллин						
Сорбент	$W \cdot 10^3$ , м/с	$Kd$ , мл/г	$t_{cp}$ , сек	$D$ , м <sup>2</sup> /с	$\lambda$	Емкость сорбции, м, мг/г
ПС	0.1	18	1300	$(3.1 \pm 0.2) \cdot 10^{-12}$	0.33	65
	0.2				0.17	
	0.4				0.08	
ПС <sup>+</sup>	0.1	31	460	$(1.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-11}$	2.79	150
	0.2				1.40	
	0.4				0.70	
Ст4	0.1	24	970	$(4.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-12}$	0.65	40
	0.2				0.32	
	0.4				0.16	
Ст5	0.1	21	2800	$(1.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-12}$	0.19	30
	0.2				0.09	
	0.4				0.05	
С-150	0.1	20	1460	$(2.3 \pm 0.1) \cdot 10^{-12}$	0.28	90
	0.2				0.14	
	0.4				0.07	
С-160	0.1	36	1540	$(3.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-12}$	0.67	175
	0.2				0.33	
	0.4				0.17	
6-АПК						
сорбент	$W \cdot 10^3$ , м/с	$Kd$ , мл/г	$t_{cp}$ , сек	$D$ , м <sup>2</sup> /с	$\lambda$	Емкость сорбции, м, мг/г
ПС	0.1	7	6900	$(9.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-13}$	0.04	15
	0.2				0.02	
	0.4				0.01	
ПС <sup>+</sup>	0.1	24	330	$(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^{-11}$	1.87	70
	0.2				0.94	
	0.4				0.47	
Ст4	0.1	19	360	$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-12}$	0.13	25
	0.2				0.06	
	0.4				0.03	
Ст5	0.1	28	1460	$(4.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-12}$	0.76	40
	0.2				0.38	
	0.4				0.19	
С-150	0.1	27	2500	$(2.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-12}$	0.42	20
	0.2				0.21	
	0.4				0.11	
С-160	0.1	23	970	$(5.7 \pm 0.1) \cdot 10^{-12}$	0.79	50
	0.2				0.39	
	0.4				0.20	

ФУК						
Сорбент	$W \cdot 10^3$ , м/с	$Kd$ , мл/г	$t_{cp}$ , сек	$D$ , м <sup>2</sup> /с	$\lambda$	Емкость сорбции, м, мг/г
Ст4	0.1	25	4000	$(1.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-12}$	0.18	25
	0.2				0.09	
	0.4				0.05	
Ст5	0.1	32	2300	$(2.3 \pm 0.1) \cdot 10^{-12}$	0.44	20
	0.2				0.22	
	0.4				0.11	
С-150	0.1	39	320	$(1.1 \pm 0.2) \cdot 10^{-11}$	2.57	150
	0.2				1.29	
	0.4				0.64	
С-160	0.1	52	210	$(2.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-11}$	9.05	240
	0.2				4.52	
	0.4				2.26	

### Заключение

По результатам исследований показано, что максимальная избирательность процесса сорбции ФУК, высокая емкость сорбции, высокие коэффициенты распределения и коэффициенты диффузии наблюдаются на сульфокатионитах С-150 и С-160. Проведена оптимизация процесса сорбции из модельной смеси исследуемых веществ на сульфокатионите С-160 по скорости пропускания подвижной фазы с использованием кинетико-динамического анализа по критериальному параметру  $\lambda$ . Установлено, что оптимальными условиями проведения процесса сорбции смеси «бензилпенициллин – 6-АПК – ФУК», при которых обеспечивается разделение компонентов являются:  $W=0,2 \cdot 10^{-3}$  м/с,  $d_{cop}=6 \cdot 10^{-4}$  м,  $pH=4,0$ . Разработка метода сорбционного разделения ФУК из смеси продуктов ферментативного гидролиза при получении 6-АПК может быть осуществлена с использованием макропористого сульфокатионита фирмы «Purolite» С-160.

### Список литературы

1. Елькин Г.Э., Глазова Н.В., Курдявка Л.В. Модификация свойств поверхности макропористых сополимеров путем адсорбции поверхностно-активных веществ // Журнал физической химии. 1994. Т.68. №9. С.1782–1783.
2. Писарев О.А., Ежова Н.М. Современные подходы к конструированию структуры полимерных сорбентов для препаративной хроматографии биологически активных веществ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Т.8. Вып.4. С.535-552.
3. Арзамасцев А.П. Фармацевтическая химия: учебное пособие. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 640 с.
4. Корчагин В.Б., Серова Н.И. Хроматографическое определение предшественников при биосинтезе пенициллинов // Проблемы антибиотиков. 1966. №1. С.65-73.
5. Полянский Н.Г., Горбунов Г.В., Полянская Н.Л. Методы исследования ионитов. М.: Химия, 1976. 208 с.



6. Кокотов Ю.А., Пасечник В.А. Равновесие и кинетика ионного обмена. Л.: Химия, 1970. 336 с.
7. Груздева А.Н., Хамизов Р.Х., Золотарева П.П. О теоретическом описании процессов внутридиффузионной сорбции и десорбции в ионообменных сорбентах// Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Т.8. Вып.1. С. 99-105.
8. Самсонов Г.В., Тростянская Е.Б., Елькин Г.Э. Ионный обмен. Сорбция органических веществ. Л.: Наука, 1969. 332 с.

---

**Ефименко Наталья Викторовна** – аспирант,  
Санкт-Петербургская химико-  
фармацевтическая академия, Санкт-Петербург,  
8(812)-312-14-58

**Котова Наталья Владимировна** – к.х.н.,  
доцент, Санкт-Петербургская химико-  
фармацевтическая академия, Санкт-Петербург

**Глазова Наталья Владимировна** – к.х.н.,  
доцент, Санкт-Петербургская химико-  
фармацевтическая академия, Санкт-Петербург

**Efimenko Natalya V.** – post-graduated student  
of St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical  
Academy, St. Petersburg,, [nefimenko88@mail.ru](mailto:nefimenko88@mail.ru)

**Kotova Natalia V.** – Ph.D., docent, St.  
Petersburg State Chemical-Pharmaceutical  
Academy, St. Petersburg

**Glasova Natalya V.** – Ph.D., docent, St.  
Petersburg State Chemical-Pharmaceutical  
Academy, St. Petersburg