

均匀设计在氟氯西林钠工艺优化中的应用

刘慧勤 严正人 王利杰 吕冠芳 黄娟*
(华北制药集团先泰药业有限公司, 石家庄 052165)

摘要: 均匀设计适用于多因素多水平的实验设计。本文采用均匀设计对氟氯西林酰胺缩合单元工艺参数进行优化, 运用 $U_{10}(10^{10})$ 均匀设计表对反应温度、加入丙酮体积和反应 pH 值 3 个因素进行了 10 个水平的筛选, 考察反应率、杂质 1~3 与因素水平之间的关系。运用 SPSS 软件对数据进行回归分析, 得到反应率、杂质 1~3 与因素水平之间的线性回归方程, 预测了氟氯西林酰胺缩合单元最佳工艺参数范围。最后对回归方程进行了试验验证, 预测值与实测值有良好的吻合。

关键词: 氟氯西林; 酰胺缩合; 均匀设计; 回归

中图分类号: R978.1⁺1, O213.1 **文献标志码:** A

Application of uniform design on the process optimization of flucloxacillin sodium

Liu Hui-qin, Yan Zheng-ren, Wang Li-jie, Lü Guan-fang and Huang Juan
(North China Pharmaceutical Group Semisynth Co., Ltd, Shijiazhuang 052165)

Abstract Uniform design is suitable for multi-factor and multi-level experimental design. In this paper, the process parameters of the flucloxacillin amide condensation reaction unit were optimized using uniform design. The $U_{10}(10^{10})$ uniform design table was used to screen the reaction temperature, the acetone volume, the pH value for 10 levels. In addition, the paper also detected the relationship between rate of reaction, impurity 1~3, and the levels of factors. By using SPSS software to regress the data, the linear regression equation between the rate of reaction, impurity 1~3, and the levels of factors was obtained. Then, the optimal process parameter range of flucloxacillin condensation unit was predicted. Finally, the regression equation was tested and verified. The predicted values and the measured values had good consistency.

Key words Flucloxacillin; Condensation of flucloxacillin amide; Uniform design; Regression

氟氯西林钠是采用 3-(2-氯, 6-氟苯基)-5-甲基-4-异噁唑酰氯在弱碱性条件下与 6-氨基青霉烷酸(下简称 6-APA)缩合而成^[1-4]。

本试验采用均匀设计方法优选酰胺缩合单元参数。一定温度下往 6-APA 溶解液中投入 3-(2'-氯-6'-氟苯基)-5-甲基-异噁唑酰氯的丙酮溶液, 反应时加入 4%NaOH 溶液 pH 值跳动较大, 因此用缓冲液

维持一定 pH 值, 直至缓冲液滴加完毕, 取反应液。应用高效液相色谱在线跟踪辅助, 以反应液中氟氯西林钠的收量和主要杂质质量为判定指标, 通过 SPSS 20.0 软件回归分析, 最终得出 4 个回归方程。

1 仪器与检测方法

1.1 仪器

Shimadzu 岛津高效液相色谱仪 LC-20A, Mettler

收稿日期: 2018-08-27

基金项目: 河北省藁城区科学技术研究与发展计划 (No. 201411)

作者简介: 刘慧勤, 女, 生于 1974 年, 工程师, 主要从事青霉素生产工作, E-mail: liuhuiqin@ncpc.com

* 通讯作者, E-mail: aminta@126.com

Toledo 实验室 pH 计 FE20, Longer pump 蠕动泵 YZ1515X。

1.2 检测方法^[5]

1.2.1 流动相配制

流动相 A: 乙腈 (R); 流动相 B: 2.7g/L 磷酸二氢钾溶液 (R), 用氢氧化钠溶液 (R) 调至 pH5.0; 硅胶柱: Hypersil Bos C₁₈(4.0mm×250mm, 5μm); 进样量: 20μL; 流速: 1mL/min

1.2.2 梯度方法设置

梯度设置为: 0 至 15min, 流动相 B 比例 25%; 15min 至 40min, 流动相 B 比例从 25% 升至 65%; 40min 至 51min, 流动相 B 比例 65%; 51min 至 65min, 流动相比比例 25%。

1.2.3 对照品配制

溶液 a: 取 5mg 6-APA、12.5mg 氟氯西林钠至 25mL 容量瓶, 加流动相 A 6mL, 用流动相 B 定容至刻度; 对照品: 取溶液 a 5mL 至 25mL 容量瓶, 加流动相 A 6mL, 用流动相 B 定容至刻度。

1.2.4 待测液配制

溶液 b: 取适量反应液至 25mL 容量瓶, 加流动相 A 5mL, 用流动相 B 定容至刻度。待测液: 取溶液 b 5mL 至 25mL 容量瓶, 加流动相 A 5mL, 用流动相 B 定容至刻度。

2 材料与操作

2.1 原料与试剂

6-APA(山西省大同市威奇达药业有限公司, 批号: 1302105)、3-(2'- 氯 -6'- 氟苯基)-5- 甲基 - 异噻唑酰氯 (衡水衡林生物科技有限公司, 批号: 20120706)、氢氧化钠 (天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号: 20130423, 分析纯)、硼酸 (天津博迪化工股份有限公司, 批号: 20100517, 分析纯)、丙酮 (天津市光复科技发展有限公司, 批号: 20120326, 分析纯)、磷酸二氢钾 (天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号: 20121013, 分析纯)、乙腈 (美国 Honeywell, 批号: DF658, 色谱纯)。

2.2 操作方案

配制碱液: 取 NaOH 1g, 加纯化水 25mL 配制成 4% NaOH 溶液。

配制 NaOH- 硼酸缓冲液 (1mol/LNaOH, pH13.40): 取 NaOH 1g、硼酸 1g, 加纯化水 25mL 搅拌溶解。

配制 3-(2'- 氯 -6'- 氟苯基)-5- 甲基 - 异噻唑酰氯溶液: 取 3-(2'- 氯 -6'- 氟苯基)-5- 甲基 - 异噻唑酰氯 6.7g, 加丙酮适量配制成溶液。

制备反应液: 取 6-APA5.4g, 加纯化水 100mL, 降温至 (5±1)℃, 滴加 4% NaOH 溶液 25mL, 滴加时间不超过 20min。滴加完后, 调节至均匀设计表中规定温度, 加入 3-(2'- 氯 -6'- 氟苯基)-5- 甲基 - 异噻唑酰氯溶液, 滴加 NaOH- 硼酸缓冲液调节至均匀设计表中规定 pH 值, 直至缓冲液滴加完毕。记录滴加时间, 取最终反应液送检。查询 U₁₀(10¹⁰) 使用表, 可知应选择第 1、5、7 列。均匀设计试验列表^[6-7],

表 1 均匀设计表

Tab. 1 The uniform design table

因子水平	A	B	C
	温度 T/℃	V _水 :V _{丙酮}	pH
1	-5±1	1:1	6.00±0.1
2	0±1	1:1.2	6.50±0.1
3	5±1	1:1.4	7.00±0.1
4	10±1	1:1.6	7.50±0.1
5	15±1	1:1.8	8.00±0.1
6	20±1	1:1	6.00±0.1
7	25±1	1:1.2	6.50±0.1
8	30±1	1:1.4	7.00±0.1
9	35±1	1:1.6	7.50±0.1
10	40±1	1:1.8	8.00±0.1

注: V_水: 6-APA 溶解完后溶液体积; V_{丙酮} 表示用于溶解 3-(2'- 氯 -6'- 氟苯基)-5- 甲基 - 异噻唑酰氯的体积

表 2 U₁₀(10¹⁰) 均匀设计表

Tab. 2 U₁₀(10¹⁰) uniform design table

因素	A	B	C
试验号	1	5	7
1	1	5	7
2	2	10	3
3	3	4	10
4	4	9	6
5	5	3	2
6	6	8	9
7	7	2	5
8	8	7	1
9	9	1	8
10	10	6	4

见表 1~2。

3 数据采集、分析与验证^[8-9]

3.1 数据采集与异常数据排除

经过迪克逊单侧检验 $D > D_{0.005}(3)$, 反应率 (反应率 = 待测样中氟氯西林钠的外标含量 / 理论收率 × 100%) 无异常数据。

3.2 回归分析

运用 SPSS 20.0 软件对表中数据进行回归和检验

表 3 实验数据表
Tab. 3 The experimental data

列号	试验号	A	B	C	批号	反应率 /%	迪克逊检验 D 值	$A_{\text{Impurity1}}/A(\%)$	$A_{\text{Impurity2}}/A(\%)$	$A_{\text{Impurity3}}/A(\%)$	反应时间 /min
		1	5	7							
	1	1	5	7	20130422a	84.807	0.9928	4.853	6.98	5.155	240
	1	1	5	7	20130422b	85.333	0.0072	4.902	7.054	5.414	240
	1	1	5	7	20130506	84.803		4.439	5.034	3.036	240
	2	2	10	3	20130424a	76.837	0.3642	5.417	9.928	7.34	240
	2	2	10	3	20130424b	78.678	0.6358	5.299	10.223	6.701	240
	2	2	10	3	2010424c	78.007		5.343	10.346	7.148	240
	3	3	4	10	20130410a	76.459	0.2662	2.188	5.351	5.442	160
	3	3	4	10	20130410b	73.625	0.7338	3.124	5.311	4.952	165
	3	3	4	10	20130411	77.487		2.075	7.352	5.824	160
	4	4	9	6	20130415a	90.235	0.2117	2.35	8.014	4.302	150
	4	4	9	6	20130415b	90.561	0.7883	2.91	4.835	4.188	150
	4	4	9	6	20130415c	89.024		3.501	5.942	4.634	150
	5	5	3	2	20130407a	81.178	0.7793	2.473	6.997	5.549	85
	5	5	3	2	20130402	83.623	0.2207	2.141	6.481	6.061	75
	5	5	3	2	20130403	80.486		2.446	6.109	5.728	75
	6	6	8	9	20130407b	55.105	0.1592	3.622	11.165	8.955	85
	6	6	8	9	20130408a	60.534	0.8408	3.321	13.155	10.473	95
	6	6	8	9	20130408b	61.562		3.16	10.236	9.664	85
	7	7	2	5	20130412a	62.985	0.8901	1.681	9.028	9.141	60
	7	7	2	5	20130425	63.276	0.1099	3.318	19.915	11.262	60
	7	7	2	5	20130426	65.632		2.992	14.07	8.888	55
	8	8	7	1	20130416	81.326	0.7783	2.511	8.712	7.065	50
	8	8	7	1	20130417a	78.597	0.2217	2.529	8.78	5.804	45
	8	8	7	1	20130417b	77.820		2.277	8.61	8.896	45
	9	9	1	8	20130508a	49.930	0.2703	7.252	25.413	14.825	40
	9	9	1	8	201300508b	51.151	0.7297	7.593	22.153	12.736	40
	9	9	1	8	20130508c	50.821		7.669	21.724	11.93	40
	10	10	6	4	20130508d	54.567	0.6619	7.088	16.498	8.939	25
	10	10	6	4	20130508e	53.717	0.3381	7.294	14.626	7.109	25
	10	10	6	4	20130508f	56.231		6.841	17.694	9.446	25

表 4 回归方程
Tab. 4 Regression equation

因变量定义	回归方程	自变量定义
反应率	$\bar{y}=153.457-0.595x_1-12231x_2-9128x_3$	x_1 : 反应温度 /℃: -5~45℃
$A_{\text{Impurity1}}/A(\%)$	$\bar{y}=-0.180+-0.044x_1+5.829x_2$	x_2 : $V_{\text{水}}:V_{\text{丙酮}}$: 0.2~1
$A_{\text{Impurity2}}/A(\%)$	$\bar{y}=1.537+0.270x_1+7.787x_2$	x_3 : 反应 pH: pH6.0~8.0
$A_{\text{Impurity3}}/A(\%)$	$\bar{y}=-2.491+0.122x_1+1.129x_3$	
平均反应率 /%	$\bar{y}=0.327+0.037x_1$	

见表 3，得表 4 方程。

根据回归方程，得出最优工艺参数为：取 6-APA，按照固液比 1:4(mol:L) 投入纯化水，滴加 4%NaOH 溶液，使 6-APA 溶解，制得 6-APA 溶解液；加入氟

氯酰氯的丙酮溶液，丙酮加入量与 6-APA 溶解液体积比为 1.2，缩合 pH6.0，缩合温度 -5℃。

3.3 验证回归方程

试验 1：取 6-APA 5.4g，加入 100mL 水，降

温至 -5℃，滴加 4% NaOH 溶液 25mL，滴加时间 20min。滴加完后加入 3-(2'- 氯 -6'- 氟苯基)-5- 甲基 - 异噁唑酰氯的丙酮溶液 (6.7g 固体 +150mL 丙酮)，控制 pH6.0，控制温度 -5℃。HPLC 检测碱液滴加完后的反应液。

试验 2：取 6-APA 5.4g，加入 100mL 水，升温至 40℃，滴加 4% NaOH 溶液 25mL，滴加时间 20min。滴加完后加入 3-(2'- 氯 -6'- 氟苯基)-5- 甲基 - 异噁唑酰氯的丙酮溶液 (6.7g 固体 +125mL 丙酮)，控制

pH8.0，控制温度 40℃。HPLC 检测碱液滴加完后的反应液。

试验 3：取 6-APA 5.4g，加入 100mL 水，升温至 5℃，滴加 4% NaOH 溶液 25mL，滴加时间 20min。滴加完后加入 3-(2'- 氯 -6'- 氟苯基)-5- 甲基 - 异噁唑酰氯的丙酮溶液 (6.7g 固体 +150mL 丙酮)，控制 pH8.0，控制温度 5℃。HPLC 检测碱液滴加完后的反应液。

4 讨论

表 5 验证试验数据
Tab. 5 Verify experiment data

验证	批号	值别	反应率 /%	$A_{\text{Impurity1}}/A(\%)$	$A_{\text{Impurity2}}/A(\%)$	$A_{\text{Impurity3}}/A(\%)$	平均反应率
1	20130613	测量值	97.303	1.123	1.107	2.066	0.487
		预测值	99.218	0.766	1.744	3.673	0.142
2	20130614	测量值	56.16	8.904	26.307	17.579	1.404
		预测值	44.402	7.409	20.124	3.518	1.807
3	20130615	测量值	93.279	1.083	1.969	2.457	0.667
		预测值	93.779	1.201	4.444	4.893	0.512

本试验通过均匀设计得到反应率、3 个主要杂质和反应温度、加入丙酮体积和反应 pH 值之间的线性回归关系，并进行了预测和验证，数据见表 5。

丙酮在反应中起到一定的相转移催化剂的作用，丙酮加入量过多，造成溶液分层，酰氯溶解在有机相中，将会导致反应速率明显下降。

参考文献

[1] 蓝红, 姜素椿. 氟氯西林胶囊剂口服的疗效及安全性临床评价 [J]. 中国抗生素杂志, 1999, 24(5): 350-352.
[2] Gujral R S, Haque S M, Shanker P. A sensitive validated spectrophotometric method for the determination of

flucloxacillin sodium[J]. *J Chem*, 2009, 6(S1): S397-S405.
[3] 张尚志. 国外异噁唑青霉素的发展概况及合成方法 (综述) [J]. 抗菌素, 1976, 1(03): 8-39.
[4] 周改平. 氟氯西林钠的合成工艺 [J]. 山西医药杂志, 2013, 42(12): 1429-1430.
[5] 陈悦. HPLC 离子对梯度洗脱法同时测定注射用阿莫西林钠 / 氟氯西林钠的含量和有关物质 [J]. 中国抗生素杂志, 2004, 29(1): 15-18.
[6] 方开泰, 马长兴. 正交与均匀试验设计 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 83-152.
[7] 张国秋, 王文璇. 均匀试验设计方法应用综述 [J]. 数理统计与管理, 2013, 32(1): 89-99.
[8] 方开泰. 均匀试验设计的理论、方法和应用—历史回顾 [J]. 数理统计与管理, 2004, 23(3): 69-80.
[9] 徐维佳, 周海虹, 陈少东. 均匀设计在中药复方研究中的应用分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 236-239.