夫西地酸晶型转化的影响因素考察

冷　凤[1]，李晓露[1]，任风芝[1]，李　宁[1]，杨朝晖[2*]

（1. 华北制药集团新药研究开发有限责任公司，微生物药物国家工程研究中心，河北省工业微生物代谢技术创新中心，河北石家庄 052165；2. 河北华北制药华恒药业有限公司，河北石家庄 051530）

摘要：采用正交试验法考察了结晶温度、抗溶剂滴加速度、结晶初始浓度以及晶种加入时机等因素对夫西地酸（**1**）多晶型的影响，结果表明结晶温度是影响 **1** 多晶型产生的关键因素，其次为抗溶剂滴加速度。当结晶温度为 40 ℃，同时抗溶剂加入速度为 0.1 ml/min 时，全部生成 **1** 无水物；结晶温度控制在 20 ～ 30 ℃，抗溶剂加入速度控制在 0.2 ml/min 以上时，可以得到合格的 **1** 半水合物。利用过程分析技术工具实时记录 **1** 抗溶剂结晶过程，揭示了 **1** 转晶过程中的变化。对制备的 **1** 半水合物和 **1** 无水物 2 种晶型进行了粉末 X 射线衍射和红外光谱法的表征分析，结果与文献报道一致。本研究结果可为 **1** 半水合物的规模化生产提供技术指导。

关键词：夫西地酸；抗溶剂结晶；过程分析；多晶型；抗菌剂

中图分类号：R978.1^{+}9；O742^{+}.6　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)10-1504-07

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.10.018

Investigation on Factors Affecting the Crystal Transformation of Fusidic Acid

LENG Feng[1], LI Xiaolu[1], REN Fengzhi[1], LI Ning[1], YANG Zhaohui[2*]

(*1. Hehei Industry Microbial Metabolic Technology Innovation Center, National Engineering Research Center of Microbial Medicine, NCPC New Drug Research & Development Co., Ltd., Shijiazhuang 052165; 2. NCPC Huaheng Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 051530*)

ABSTRACT: The effects of the crystallization temperature, the dripping rate of antisolvent adding, the initial concentration of the crystallization and the occasion of seed crystal adding on the polymorph formation of fusidic acid (**1**) were investigated by the orthogonal experiment. The results showed that the crystallization temperature was the key factor affecting the polymorph formation of **1**, followed by the dripping rate of antisolvent. Anhydrous **1** was formed when the antisolvent dripping rate was 0.1 ml/min and crystallized at 40 ℃, while **1** hemihydrate was obtained with more than 0.2 ml/min of dripping rate and 20 – 30 ℃ of crystallization temperature. The crystallization process of **1** was recorded online in real time with process analysis technology tools, and the transformation process of **1** crystal forms was revealed. Powder X-ray diffractometry (PXRD) and infrared spectroscopy (IR) were applied for both anhydrate and hemihydrate products. The analysis results were consistent with the literature reports. The experimental results could provide technical guidance for the large-scale production of **1** hemihydrate.

Key Words: fusidic acid; antisolvent crystallization; process analysis; polymorphism; antibacterial agent

夫西地酸（fusidic acid，**1**）对组织和体液的穿透力极强、血浆半衰期长、患者耐受性好，独特的抗菌机制和低耐药率使其抗感染活力持久稳定[1]；临床上用于治疗严重的葡萄球菌感染，如败血病、骨髓炎、心内膜炎、创伤性感染等疾病[2]，特别是针对各种皮肤感染的疾病有良好疗效。近年来，有研究发现 **1** 还具有抗病毒和免疫调节的作用[3]，增加了 **1** 临床应用价值。

1 的半水合物分子式为 $C_{31}H_{48}O_6 \cdot ½\ H_2O$，相对

收稿日期：2022-02-08

作者简介：冷　凤(1981—)，女，高级工程师，从事药物的纯化和结晶工艺研究。

通信作者：杨朝晖(1971—)，男，高级工程师，从事微生物药物研究。

E-mail：zhaohuiyang_71@sina.com

分子质量为 525.7，可溶于乙醇、甲醇、丙酮、氯仿、吡啶等溶剂，几乎不溶于水、乙醚、正己烷。**1** 化学结构（图 1）中具有甾体结构，大体上与头孢菌素 P1、烟曲霉酸有相似之处，但有个别基团不同，正是这些不同的基团增加了它的抗菌活性[4]。

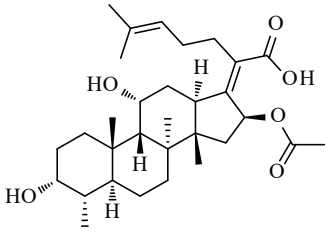


图 1 1 的结构式

Fig.1 Chemical Structure of **1**

1 是多晶型药物，具有半水合物晶型[5]，以及 3 种无水物晶型，临床使用的 **1** 为半水合物，市售 **1** 也均为其半水合物。

目前，**1** 半水合物的结晶多采用抗溶剂结晶法，其理论含水量为 1.7%，欧洲药典（EP 10.0）规定其含水量为 1.5%～2.0%。然而本品在规模化生产时水分精准控制的难度较大，水分含量低于 1.0%的情况时有发生，不符合产品质量要求。针对上述问题，本研究利用过程分析技术工具对 **1** 抗溶剂结晶过程进行深入研究，考察了结晶温度、抗溶剂滴加速度、结晶液初始浓度以及晶种加入时机对 **1** 半水合物结晶的影响，揭示了影响 **1** 半水合物晶型的关键因素并对其进行了优化控制，为稳定制备高品质 **1** 半水合物产品提供参考。

1 仪器与试药

Optimax 1001 型全自动结晶器、500 ml 反应釜、D600L 型聚焦光束反射测量仪、颗粒显微录影仪和 V10S 型卡尔费休水分仪（瑞士 Mettler Toledo 公司）；DM500-ICC50 型显微镜（德国 Leica 公司）；MAGNA-IR 550 型红外光谱仪（美国 Nicolet 公司）；Mastersizer 2000 型激光粒度仪（英国马尔文仪器有限公司）；D8 Advance 型粉末 X 射线衍射仪（德国 Bruker 公司）。

1 粗品（本公司自制，含量分别为 98.15%、98.21%、98.28 %、98.74 % 和 99.05 %，批号分别为 FA190305、FA180901、FA180801、FA180702 和 FA180603）；无水乙醇为分析纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 1 含水量与晶体形态的相关性研究

选取不同批次 **1** 粗品，采用卡尔费休法测水分含量，在显微镜下观察晶体形态。取少量样品用激光粒度仪测量粒径及粒度分布，工作参数设置为：折射率 1.5，吸收率 0，背景和样品测量时间 5 s，振动速度 40%，分散气压 300 kPa，遮光度范围 1%～6%。结果见表 1、图 2 和图 3。

由表 1 和图 2 可知，**1** 有片状和棒状 2 种晶体形态，且晶体形态与水分含量密切相关。当水分含量达到 1.7%时，全部为片状晶体（图 2a）；当水分含量低于 1.7%时为片状晶体和棒状晶体的混合物（图 2b ～ 2d）；当水分含量为 0 时，全部为棒状晶体（图 2e）。

由图 3 的粒度分布曲线可知，片状晶体的粒径较大，分布较为集中，而棒状晶体的粒径较小，分布较宽；当产品为混晶时，粒度分布曲线呈现双峰。

2.2 1 半水合物结晶条件选择

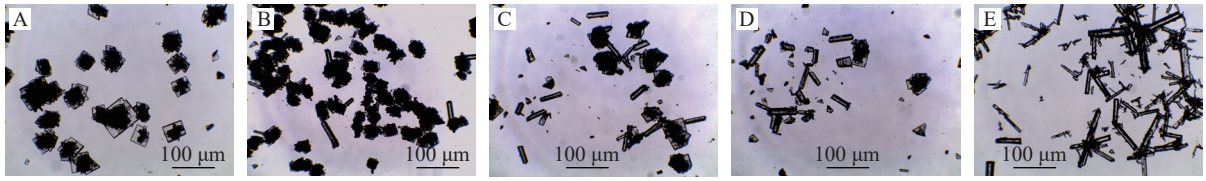
2.2.1 1 的结晶方法

将 **1** 粗品溶于无水乙醇 100 ml 中；以水为抗溶剂，边搅拌边滴加至 **1** 溶液中。当抗溶剂加至乙

表 1 1 水分含量与晶体形貌的相关性（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.1 Correlation between Water Content and Crystal Form of **1** ($\bar{x}\pm s$, n=3)

批号	序号	含水量/%	晶体形貌	粒度分布曲线形态	d(0.9)/μm
FA190305	a	1.71±0.04	全部为片状	单峰	105.34±1.23
FA180901	b	1.32±0.05	多数片状，混有少数棒状	双峰	93.27±2.07
FA180801	c	0.73±0.03	片状棒状都有	双峰	68.51±1.78
FA180702	d	0.42±0.04	多数棒状，混有少数片状	双峰	59.44±1.59
FA180603	e	0±0.02	全部为棒状	单峰	55.62±2.34



A ～ E：分别为序号 a ～ e。

图 2　不同批次 1 的晶体形态（×100）

Fig.2　Crystal Forms of Different Batches of **1**（×100）

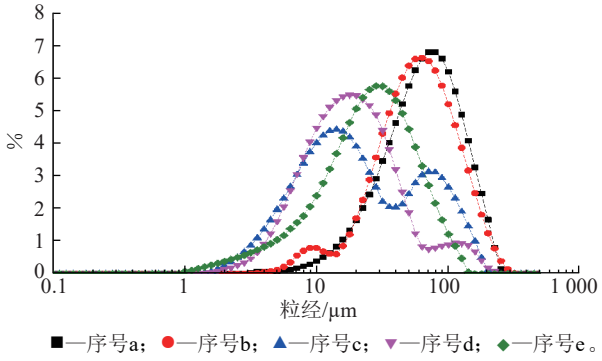


图 3　不同批次 1 的粒度分布曲线

Fig.3　Particle Size Distribution Curves of Different Batches of **1**

醇体积的 45％～ 55％时，按 5％比例加入 **1** 半水合物晶种（将批号 FA190305 的产品过筛，取孔径 96 ～ 120 μm 的筛分），养晶 0.5 ～ 1.0 h，再滴加抗溶剂，使抗溶剂总用量为有机溶剂的 1.2 ～ 2.0 倍。加料结束后继续搅拌 1 ～ 3 h，过滤晶浆，滤饼用水洗涤，减压干燥后得到 **1** 产品。

2.2.2　正交试验设计与结果

以抗溶剂滴加速度（*A*）、结晶温度（*B*）、加入晶种时乙醇与水的体积比（*C*）以及结晶初始浓度（*D*）为考察因素，每个因素设置 3 个水平，以产品含水量为考察指标，进行正交试验。因素水平设置见表 2。产品含水量、晶体形貌及粒度分布曲线形态结果见表 3。

极差分析结果表明，4 个因素对 **1** 晶型的影响程度依序为 *B*>*A*>*C*>*D*，即影响 **1** 晶型最关键的因素是结晶温度，其次是抗溶剂加入速度，而结晶浓度和晶种加入时机对 **1** 晶型的影响程度较小。不考虑结晶浓度和晶种加入时机，从试验 7 ～ 9 结果来看，以 0.3 ml/min 的速度加入抗溶剂，温度在 20

表 2　正交试验因素水平表

Tab.2　Factors and Levels of the Orthogonal Test

因素	水平		
	1	2	3
A/ml·min^{-1}	0.1	0.2	0.3
B/℃	20	30	40
C	1∶0.45	1∶0.50	1∶0.55
D/g·ml^{-1}	0.2	0.3	0.4

和 30 ℃时都能得到合格的产品，而在温度为 40 ℃时就会生产混晶。说明较高的结晶温度会产生 **1** 无水物。从试验 2、5、8 结果来看，在结晶温度为 30 ℃时，以 0.3 ml/min 的速度加入抗溶剂能生成合格的 **1** 半水合物，而速度≤ 0.2 ml/min 就会产生混晶，说明较慢的结晶速度会生产 **1** 无水物。综上所述，当结晶温度过高，同时抗溶剂加入速度过慢时，会利于生成 **1** 无水物；试验 3 的结果印证这一推测，即在较高的温度（40 ℃）下，以较慢的速度（0.1 ml/min）加入抗溶剂，会全部生成棒状晶体。

试验中观察到，试验 7 所得的产品含水量最高，提示在较低的温度（20 ℃）下，以较快的速度加入抗溶剂（0.3 ml/min），有利于生成 **1** 半水合物。结合试验 4 和 8 所得产品的含水量符合标准的结果可推断，抗溶剂加入速度控制在 0.2 ml/min 以上，结晶温度控制在 30 ℃以下，能得到合格的 **1** 半水合物产品。

2.2.3　**1** 结晶过程的在线分析

本试验中，将颗粒显微录影仪（particle vision measurement，PVM）和聚焦光束反射测量仪（focused beam reflectance measurement，FBRM）联用，在线记录结晶过程的动态变化，PVM 记录晶体照片，FBRM 记录系统内总粒子数变化，表 3 中试验 3 和 7 的监测结果如图 4 和图 5 所示。

表 3 正交试验设计与结果

Tab.3 Design and Results of the Orthogonal Test

序号	*A*	*B*	*C*	*D*	含水量/%	晶体形貌	粒度分布曲线形态
1	1	1	1	1	1.32	混晶	双峰
2	1	2	2	2	0.91	混晶	双峰
3	1	3	3	3	0	全部为棒状	单峰
4	2	1	2	3	1.63	全部为片状	单峰
5	2	2	3	1	1.25	混晶	双峰
6	2	3	1	2	0.52	混晶	双峰
7	3	1	3	2	1.74	全部为片状	单峰
8	3	2	1	3	1.54	全部为片状	单峰
9	3	3	2	1	1.01	混晶	双峰

试验 3 过程中（如图 4 所示），从 PVM 获取的图像中可清晰观察到，在结晶初期，加入 **1** 半水合物晶种之后，所产生的晶体均为片状（a 点）。随着结晶的进行，开始出现少量的棒状晶体（b 点）。随着粒子数缓慢增长，大量片状晶体逐渐破碎、溶解，轮廓模糊，棒状晶体逐渐增多（c 点），体系粒子数随即陡增。结晶后期，片状晶体全部转化为棒状（d 点），体系粒子数趋于稳定。

试验 7 过程中（图 5），结晶初期，加入片状的 **1** 半水合物晶种后，系统的粒子数骤升至一定水平后一直保持平稳，粒子体积比较小，直径不足 50 μm（a 点）；随着结晶的进行，片状晶体不断长大（b 点），直径超过 50 μm；到达结晶终点时，粒子的体积更大（c 点），直径达到近 100 μm，且全部为片状晶体，而粒子数基本保持不变。

2.3 1 半水合物和无水物晶型的表征

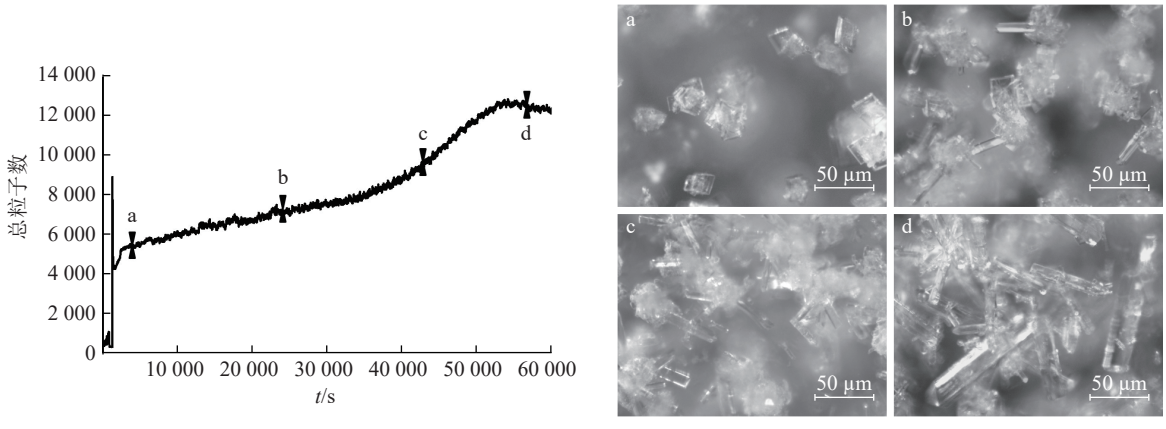
将试验 3 所得的 **1** 无水物与试验 7 的所得 **1** 半水合物进行粉末 X 射线衍射和红外光谱分析，结果见图 6、图 7。

图 6A 中 **1** 半水合物 PXRD 图谱特征峰位于 5.7、6.7、7.8、13.4、15.5、16.0 和 16.4 ° 处，图 6B 中 **1** 无水物 PXRD 图谱特征峰位于 7.2、12.6、13.0、14.7、14.9、18.1 和 22.6 ° 处，均与文献报道一致 [5]。

图 7 中，2 种晶型样品的红外吸收光谱在官能团区 3 800 ～ 2 600 和 1 800 ～ 1 600 cm^{-1} 及指纹区 1 350 ～ 700 cm^{-1} 均有较大差异，可见引入结晶水对 **1** 分子作用力改变影响较大。图 7A 中官能团区 3 436 cm^{-1}（宽，m）、2 960 cm^{-1}、1 748 cm^{-1}（尖，vs）、1 687 cm^{-1}（尖，vs）的特征吸收峰及指纹区 1 443 cm^{-1}、1 380 cm^{-1}、1 228 cm^{-1}（尖，vs）、1 029 cm^{-1}、975 cm^{-1}（尖，m）等特征吸收峰（±3 cm^{-1}）与文献报道的半水合物一致 [5]，由此证实为 **1** 半水合物。而 7B 图中的 3 644、3 490、1 709、1 381、1 255 和 962 cm^{-1} 等特征峰（±3 cm^{-1}）则与文献报道的无水物一致 [5]。

2.4 1 半水合物结晶工艺的验证

照“**2.2.2**”项下正交试验优选出的利于生成 **1** 半水合物的工艺参数范围，进行 **1** 半水合物结晶工

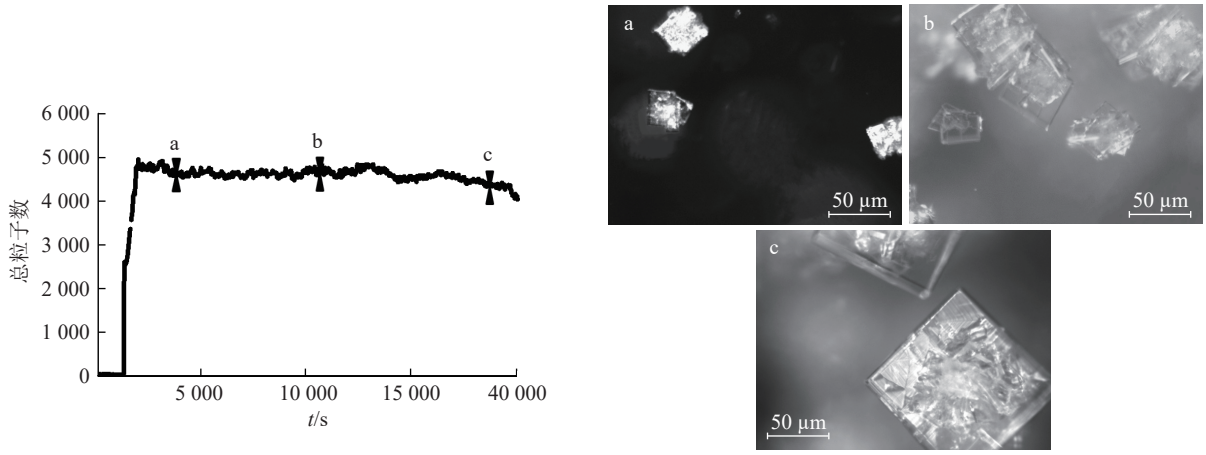


A B

A：试验 3 中 **1** 的结晶过程，B：结晶过程中 4 个时间点（即图 A 中 a ～ d 4 个时间点）的显微照片（×400）。

图 4 1 棒状晶型的结晶过程

Fig.4 Crystallization Process of **1** Clavate Crystal Form

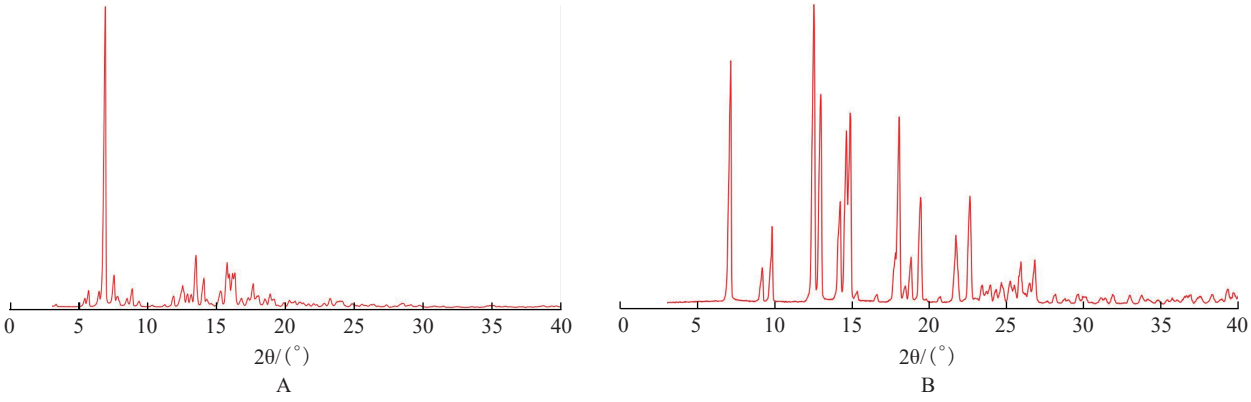


A　　B

A：试验 7 中 **1** 的结晶过程，B：结晶过程中 3 个时间点（即图 A 中 a ～ c 3 个时间点）的显微照片（×400）。

图 5　1 片状晶型的结晶过程

Fig.5　Crystallization Process of **1** Lamellar Crystal Form



A：**1** 半水合物，B：**1** 无水物。

图 6　2 种晶型的 PXRD 图谱

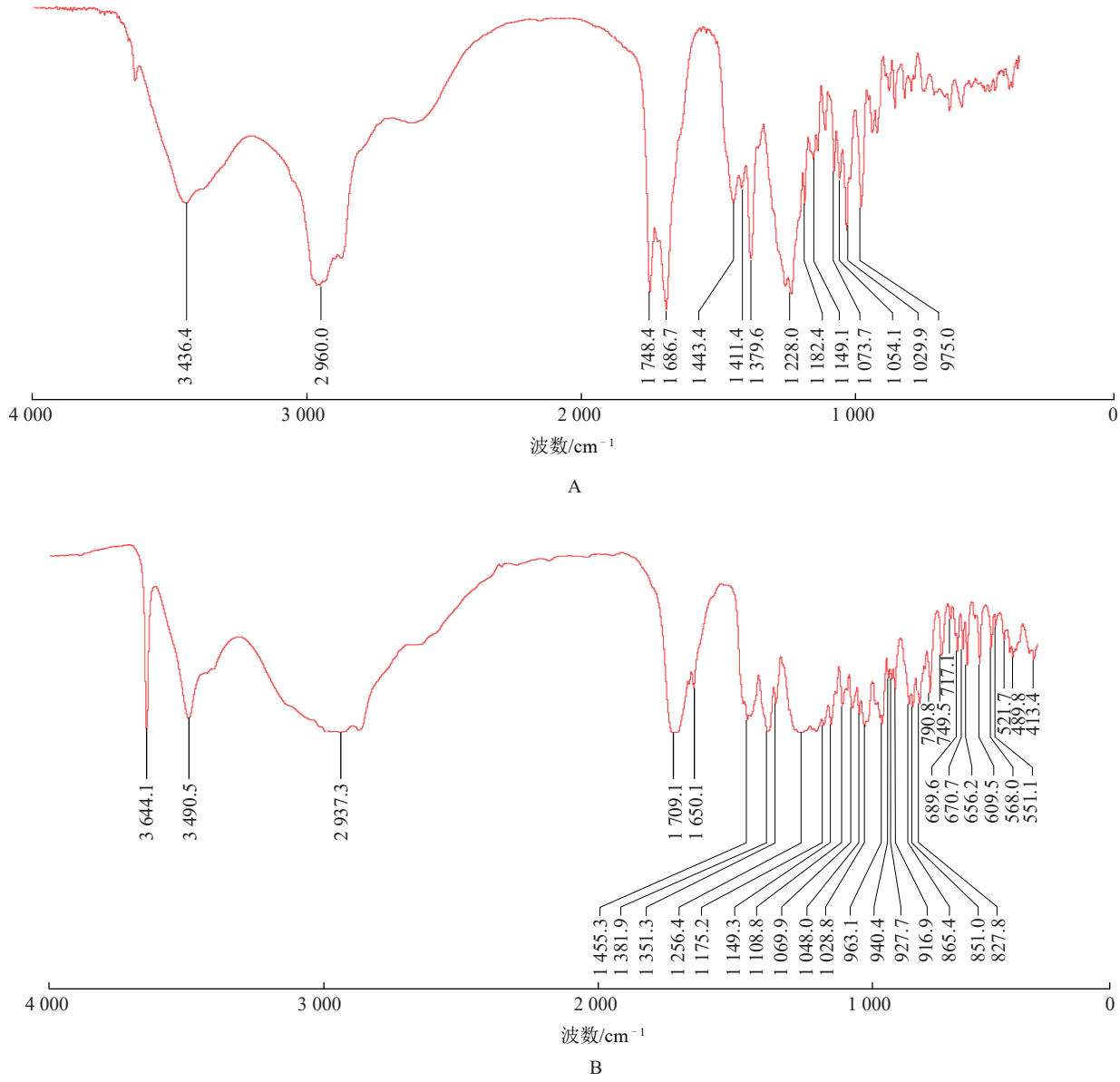
Fig.6　PXRD Patterns of Two Crystal Forms

艺验证：结晶参数设置及收率、水分含量、晶体形貌等结果见表 4。所得产品进行 PXRD 测定，结果见图 8。

由表 4 和图 8 可知，照优选的 **1** 半水合物结晶工艺参数范围，可获得 **1** 半水合物片状晶体，且工艺稳定、重现性好。试验 11 和 13 表明即使抗溶剂流速升高至 3.5 ml/min（注：批量扩大 9 倍，流速相应增大 9 倍）也能得到合格的产品。

3　讨论

本研究针对 **1** 生产中水分含量不易控制、常出现混晶的问题，通过正交试验法考察了结晶温度、抗溶剂的滴加速度、结晶初始浓度及晶种加入时机对 **1** 结晶的影响，并利用过程分析工具，对 **1** 结晶过程进行实时记录。结果表明，结晶温度和抗溶剂的滴加速度是影响 **1** 晶型的关键因素。当结晶温度低于 30 ℃、同时抗溶剂滴加速度较快时，有利于



A：**1** 半水合物，B：**1** 无水物。

图 7　2 种晶体的红外光谱图

Fig.7　IR Spectra of Two Crystal Forms

表 4　1 半水合物结晶工艺参数及验证结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.4　Crystalline Process Parameters and Verification Results of **1** Hemihydrate ($\bar{x}\pm s$, n=3)

试验编号	投料量/g	乙醇用量/ml	温度/℃	水滴加速度/ml·min⁻¹	收率/%	含水量/%	显微形貌
10	200	1 000	20	3.0	97.1±0.05	1.77±0.02	片状结晶
11	200	1 000	20	3.5	96.9±0.11	1.72±0.03	片状结晶
12	250	1 000	25	3.0	97.8±0.06	1.75±0.05	片状结晶
13	250	1 000	30	3.5	98.1±0.09	1.74±0.03	片状结晶

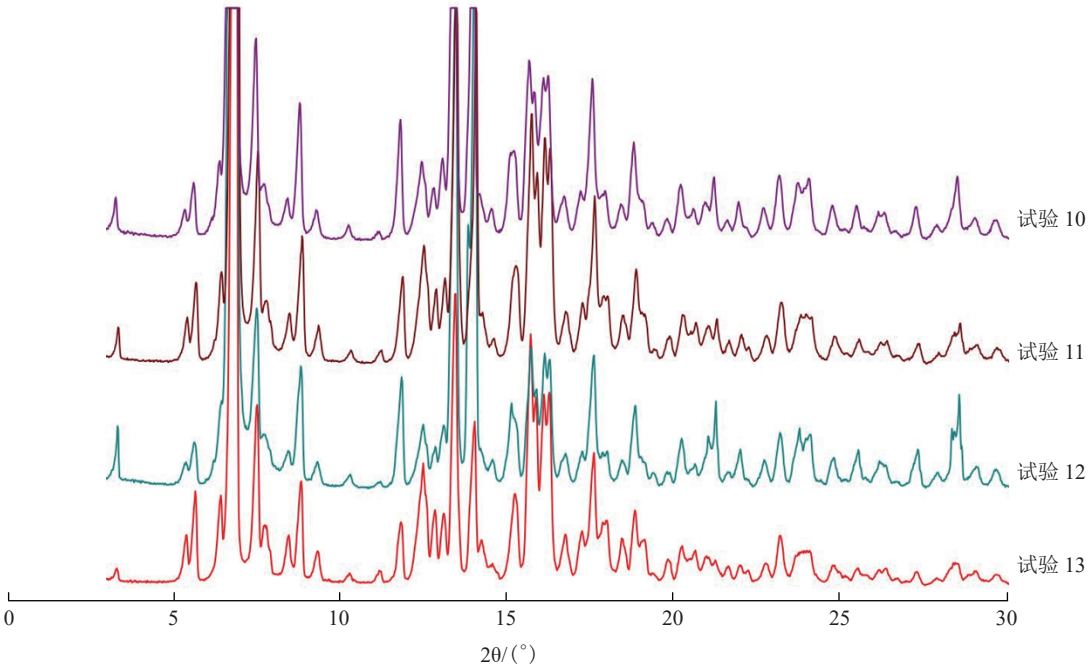


图 8　4 批 1 半水合物粉末衍射图

Fig.8　PXRD Patterns of Four Batches of **1** Hemihydrate

生成 **1** 半水合物。本研究结果对规模化生产中 **1** 半水合物晶型的稳定控制提供了重要参考。

参考文献：

[1] CURBETE M M, SALGADO H R. A critical review of the properties of fusidic acid and analytical methods for its determination [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2016, **46**(4): 352-360.

[2] 李　军. 一种提取分离夫西地酸的方法: 中国, 101792476A [P]. 2010-08-04.

[3] 杜天飞, 江世平, 王明蓉, 等. 夫西地酸产生菌SIIA06-05-201的鉴定及其次级代谢产物FA-3的结构分析[J]. 中国抗生素杂志, 2008, **33**(3): 145-147.

[4] 赵苗苗. 夫西地酸菌种选育及发酵工艺优化[D]. 上海: 中国医药工业研究总院硕士学位论文, 2020.

[5] 詹森·J，安德森·N·R. 结晶抗生素夫西地酸的制备: 中国, 1010351471A [P]. 2009-01-21.