

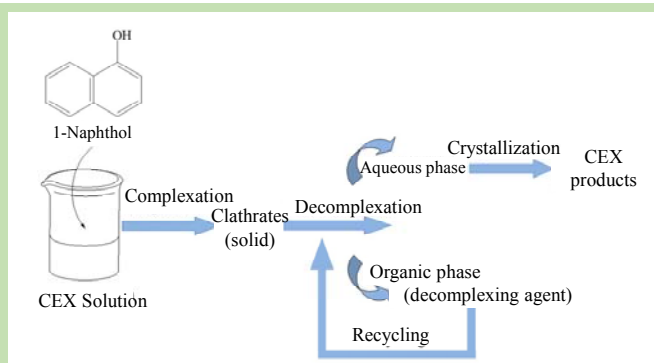
## Recovery of cephalixin with complexation

Xin WANG<sup>1</sup>, Zhengsheng MA<sup>1</sup>, Qingfen LIU<sup>2\*</sup>

1. School of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China;

2. CAS Key Laboratory of Green Process and Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

**Abstract:** Cephalixin (CEX) was a widely used antibiotic in clinic. The proportion of CEX in crystalline mother liquor was about 10%, which must be recovered in order to decrease economic losses, environmental pollution and prevent the rise of drug-resistant bacteria. The preparation of CEX by enzymatic-catalyzed is a green pharmaceutical technology, but recovery of CEX from the crystalline mother liquor had not been studied systematically. In this work, the recovery of CEX in the



crystalline mother liquor by enzymatic-catalyzed preparation was investigated with benzene and naphthalene compounds as complexing agents. The effect factors including complexing agent type, complexing agent dosage, pH, temperature, concentration of residual raw materials and by-product on CEX complexation process were systematically studied, and an optimization scheme was proposed. The results showed that CEX complexation rate was higher using naphthalene compounds as complexing agents than that of benzene compounds. The type of complexing agent and its dosage, pH were key factors on CEX complexation rate, while the temperature, concentration of residual raw materials and main by-product, such as 7-amino-3-desacetocephalosporanic acid (7-ADCA), phenylglycine methyl ester hydrochloride (PGME) and phenylglycine (PG) had no significant effect on CEX complexation rate. The optimum parameters were as follows: 1-naphthol dosage of 4.4 g/L, pH of 4.72 and temperature of 293 K. Under the optimal conditions, the CEX complexation rate was more than 97.0%, which increased by 5.0% compared to that in the conventional industrial process. Using dichloromethane as a decomplexing agent, the total recovery rate of CEX was more than 92%. Furthermore, the CEX products were analyzed by HPLC, the content of CEX, 1-naphthol were 98.5% and 0.009%, respectively. While the impurities in the CEX products, such as 7-ADCA, PGME and PG were not detected. The quality of CEX products conformed to Chinese pharmacopeia standard. This work suggested an effective approach for CEX recovery and pollutions decrease.

**Key words:** cephalixin; crystalline mother liquor; complexation; recovery

收稿: 2018-02-19, 修回: 2018-04-11, 网络发表: 2018-06-27; Received: 2018-02-19, Revised: 2018-04-11, Published online: 2018-06-27

基金项目: 水体污染控制与治理科技重大专项(编号: 2017ZX07402003); 国家自然科学基金资助项目(编号: 21676272); 中国科学院重点部署项目(编号: ZDRW-ZS-2016-5-3)

作者简介: 王新(1993-), 女, 陕西省西安市人, 硕士研究生, 应用化学专业, E-mail: wangxin114119@163.com; 刘庆芬, 通讯联系人, E-mail: qfliu@ipe.ac.cn.

**引用格式:** 王新, 马政生, 刘庆芬. 头孢氨苄络合回收工艺. 过程工程学报, 2018, 18(6): 1232-1238.

Wang X, Ma Z S, Liu Q F. Recovery of cephalixin with complexation (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2018, 18(6): 1232-1238, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.218132.

# 头孢氨苄络合回收工艺

王新<sup>1</sup>, 马政生<sup>1</sup>, 刘庆芬<sup>2,\*</sup>

1. 西北大学化工学院, 陕西 西安 710069

2. 中国科学院过程工程研究所绿色过程与工程重点实验室, 北京 100190

**摘要:** 以苯系和萘系化合物为络合剂, 研究头孢氨苄结晶母液中头孢氨苄的富集回收过程, 考察了络合剂种类、剂量、pH、温度、残留原料和副产物浓度对头孢氨苄络合过程的影响, 确定了关键影响因素, 建立和优化了工艺过程。结果表明, 络合剂种类、剂量和 pH 是影响头孢氨苄络合率的关键因素, 其它因素对头孢氨苄络合率无明显影响。最佳络合工艺为 1-萘酚剂量 4.4 g/L, pH 为 4.72, 温度 293 K, 此时头孢氨苄的络合率大于 97.0%, 比目前生产工艺提高了 5.0%。

**关键词:** 头孢氨苄; 结晶母液; 络合; 回收

**中图分类号:** TQ465.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2018)06-1232-07

## 1 前言

头孢氨苄(CEX)是一种头孢类抗生素, 广泛用于临床<sup>[1-3]</sup>, 2013 年国内使用量约 2670 t<sup>[4]</sup>。头孢氨苄可采用化学合成法或酶催化合成法制备<sup>[5-7]</sup>, 其等电点 pH 值为 4.72, 工业生产中通常采取等电点结晶法分离反应液中的头孢氨苄, 结晶母液中头孢氨苄的残留量约为 12~15 g/L, 约占总量的 10%。因此, 必须回收结晶母液中残留的头孢氨苄, 否则将会造成经济损失和严重的环境污染, 甚至有诱发耐药菌和超级细菌的危险<sup>[8,9]</sup>。

结晶母液中残留头孢氨苄的回收方法有树脂法<sup>[10]</sup>、双水相萃取法<sup>[11]</sup>、液膜法<sup>[12]</sup>、膜浓缩<sup>[13]</sup>和络合法<sup>[14]</sup>等。在树脂法回收中, 树脂再生产生大量难处理的酸碱废液, 严重污染环境; 在双水相萃取法回收中, 成相组分回收成本高, 产业化难; 在液膜法回收中, 膜溶剂易流失, 膜使用寿命较短; 采用纳滤膜浓缩结晶母液, 设备投资大; 络合法具有选择性好、效率高等优点<sup>[15,16]</sup>, 适用于溶液中低浓度头孢氨苄的富集。文献<sup>[14,17,18]</sup>以萘类等物质为络合剂, 从形成络合物沉淀晶体结构的角度, 研究了萘类化合物与头孢氨苄络合反应的可能性及络合剂种类对络合后头孢氨苄残留浓度的影响, 对络合剂的选择有借鉴意义, 但并未涉及络合反应工艺过程。Schroën 等<sup>[19]</sup>在酶法催化合成头孢氨苄过程中加入了 2-萘酚、1,5-二羟基萘、2,7-二羟基萘、2,3-二羟基萘四种络合剂, 原位络合分离头孢氨苄, 并研究了催化合成过程中酶活性的变化, 证实了 2,7-二羟基萘、2,3-二羟基萘对酶活性损失影响较大, 另外两种络合剂对酶活性影响较小。该研究中络合剂的消耗量是结晶母液中络合头孢氨苄所需络合剂量的数倍, 不仅增加生产成本, 还产生大量的络合剂污染。在工业生产中, 普遍采用化学合成法制备头孢氨苄, 结晶母液中的头孢氨苄采用 2-萘酚为络合剂进行络合回收, 头孢氨苄的络合率较低(92%)。

酶法催化合成头孢氨苄是一种有应用前景的绿色制药技术, 具有催化合成效率高、污染低的优势, 近年来在外企已经实现了产业化。随着国内酶法催化合成技术的发展, 头孢氨苄的酶法制备也将实现大规模产业化。酶法合成头孢氨苄的结晶母液中主要成分为头孢氨苄、残留在水溶液中未反应的原料 7-氨基-3-去乙酰氧基头孢烷酸(7-ADCA)、苯甘氨酸甲酯盐酸盐(PGME)和反应副产物 D-苯基甘氨酸(PG)。目前未见络合回收酶法结晶母液中头孢氨苄的研究报道。

本工作系统地研究了结晶母液中低浓度头孢氨苄的络合回收工艺过程, 考察了络合剂种类及剂量、pH、温度、残留原料 7-ADCA 和 PGME、副产物 PG 浓度等因素对头孢氨苄络合过程的影响, 确定了关键影响因素, 研究了络合过程的调控规律及对产品质量的影响, 建立并优化了头孢氨苄络合回收工艺, 为提高头孢氨苄络合率、降低污染物排放提供一种新方法。

## 2 实验

### 2.1 材料与试剂

头孢氨苄一水合物、7-氨基-3-去乙酰氧基头孢烷酸(7-ADCA)、苯甘氨酸甲酯盐酸盐(PGME)均由华北制药股份公司提供, 于 4℃冰箱中保存。1-萘酚、2-萘酚、萘、邻苯二酚、对苯二酚、甲醇、对羟基苯甲酸丙酯均为分析纯, 2,7-二羟基萘(纯度 98%)、对羟基苯甲酸甲酯(CP)、对羟基苯甲酸乙酯(CP)均购于国药集团化学试剂有限公司, 1,6-二羟基萘、2,3-二羟基萘和间氨基苯酚纯度均为 98%, 购于上海麦克林生化科技有限公司。1,5-二羟基萘(纯度 98%)、邻氨基苯酚(纯度 99%)、间苯二酚(AR)、对氨基苯酚(AR)、2-苯基苯酚(纯度 98%)及 D-苯基甘氨酸(PG)均购于阿拉丁试剂有限公司。

### 2.2 实验设备与分析仪器

HI221 台式酸度计(意大利 HANNA 公司), 90-4 磁力搅拌器(上海振容科学仪器有限公司), 安捷伦 1260 高效液相色谱仪(HPLC, 美国安捷伦公司)。

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 络合反应

在酶法制备头孢氨苄的结晶母液中, 主要成分为头孢氨苄 15 g/L, 反应原料残留 7-ADCA 4 g/L 和 PGME 25 g/L, 副产物 PG 6 g/L。

本工作以头孢氨苄模拟结晶母液为原料, 其中头孢氨苄浓度为 14 g/L, 溶液 pH=4.72(等电点)。研究 pH 的影响时, 用 6 mol/L 硫酸溶液或浓氨水调节模拟母液 pH 值。络合剂用少量甲醇溶解, 得到络合剂溶液。

量取一定量头孢氨苄模拟母液和络合剂溶液, 在一定温度及 pH 值下, 将络合剂溶液缓慢加入头孢氨苄模拟母液中, 在磁力搅拌下进行络合反应。用 HPLC 检测溶液中头孢氨苄的浓度, 测定络合反应平衡时间, 计算头孢氨苄的络合率  $E(\%)$ :

$$E = \frac{C_{\text{Initial}} V_{\text{Initial}} - C_{\text{Residual}} V_{\text{Residual}}}{C_{\text{Initial}} V_{\text{Initial}}} \times 100\%,$$

式中,  $C_{\text{Initial}}$ ,  $C_{\text{Residual}}$  分别为模拟母液和络合反应后溶液中残留的头孢氨苄的浓度(g/L),  $V_{\text{Initial}}$ ,  $V_{\text{Residual}}$  分别为模拟母液和络合反应后溶液的体积(L)。

### 2.3.2 分析检测

用 HPLC 检测头孢氨苄浓度: 色谱柱 4.6 mm×150 mm, C18(G1316A)柱, 二极管阵列检测器(G4212B),

柱温 313 K, 检测波长 260 nm。流动相组成为 70%磷酸钠缓冲盐(20 mmol/L, pH=7.0)和 30%甲醇, 流速 1 mL/min。样品稀释一定倍数, 进样量 20  $\mu$ L。

用 HPLC 检测头孢氨苄产品中 7-ADCA, PGME 和 PG 浓度, 柱温 303 K, 检测波长 220 nm, 流动相 A 为磷酸二氢钠溶液(0.2 mol/L, pH=5.0), 流动相 B 为甲醇。采取梯度洗脱, 其它条件同上。流动相 A 和 B 的体积比见表 1。

表 1 梯度洗脱流动相 A 和 B 的体积比

Table 1 The volume proportion of mobile phase A and B		
Time/min	Mobile phase A/%	Mobile phase B/%
0	98	2
1	98	2
20	70	30
23	98	2
30	98	2

用 HPLC 检测头孢氨苄产品中 1-萘酚, 检测波长 225 nm, 流动相为 45%超纯水和 55%甲醇, 其它条件同上。

## 3 结果与讨论

### 3.1 络合反应现象

图 1 为头孢氨苄络合过程示意图。随络合剂加入, 络合反应发生, 溶液开始混浊。约 10 min 后反应体系中头孢氨苄的浓度不再变化, 表明络合反应达到平衡。将所得混浊液过滤、烘干, 得头孢氨苄络合物沉淀, 实现了水溶液中低浓度头孢氨苄的富集回收。

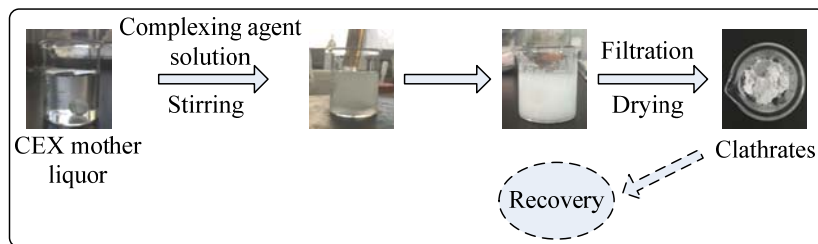


图 1 头孢氨苄的络合过程示意图

Fig.1 The scheme of CEX complexation process

### 3.2 络合回收过程

#### 3.2.1 络合剂的影响

研究<sup>[20]</sup>表明, 头孢氨苄的络合反应可以在 278 K 下进行。在 278 K 下考察了苯系和萘系络合剂对头孢氨苄络合率的影响, 结果如图 2 所示。可以看出, 苯系络合剂中, 间苯二酚对头孢氨苄的络合率最高, 达 80.3%; 萘系络合剂中, 1-萘酚和 1,6-二羟基萘对头孢氨苄的络合率最高, 分别达 97.6%和 98.0%。萘系络合剂对头孢

氨苄的络合率均高于苯系络合剂。络合剂与头孢氨苄反应过程中, 二者通过氢键结合<sup>[18]</sup>。萘系化合物结构中有一个大的离域萘环, 其供电子能力强, 更易与头孢氨苄形成络合物。络合剂与头孢氨苄形成氢键的能力不同导致了络合收率的差别。另外, 在络合过程中, 络合剂与头孢氨苄侧链上的苯环还存在  $\pi$ - $\pi$  相互作用, 使萘系络合剂对头孢氨苄络合率较高。由此可见, 络合剂种类是影响头孢氨苄络合率的关键因素。

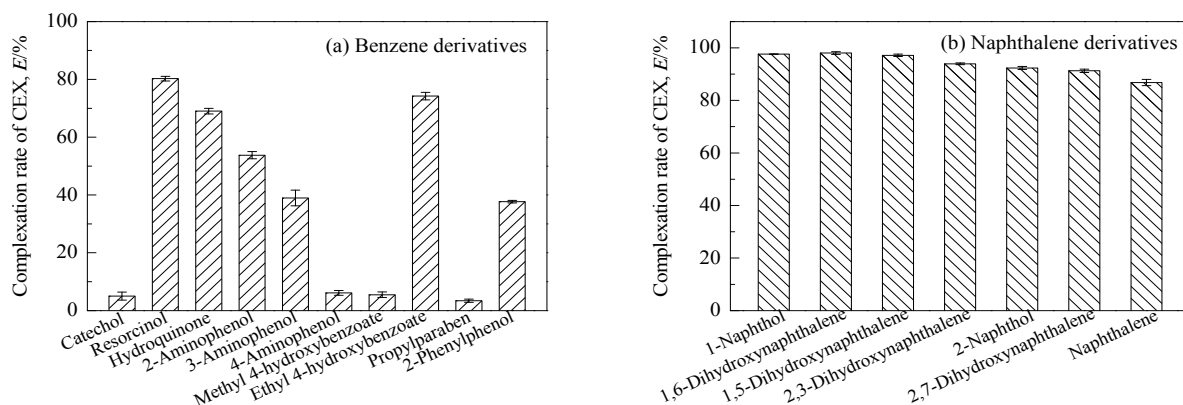


图 2 苯系和萘系络合剂对头孢氨苄络合率的影响

Fig.2 Effects of benzene and naphthalene complexing agents on CEX complexation rate

### 3.2.2 1-萘酚剂量的影响

在 278 K 及 pH=4.72 的条件下, 考察了 1-萘酚剂量对头孢氨苄络合率的影响, 结果如图 3 所示. 可以看出, 随 1-萘酚剂量增加, 头孢氨苄的络合率先上升后不变. 当 1-萘酚剂量由 2.76 g/L 增至 4.4 g/L 时, 头孢氨苄的络合率由 91.39% 升至 97.52%, 再增加 1-萘酚的剂量, 头孢氨苄的络合率基本不变. 因此, 1-萘酚剂量是影响络合率的关键因素, 最佳剂量为 4.4 g/L.

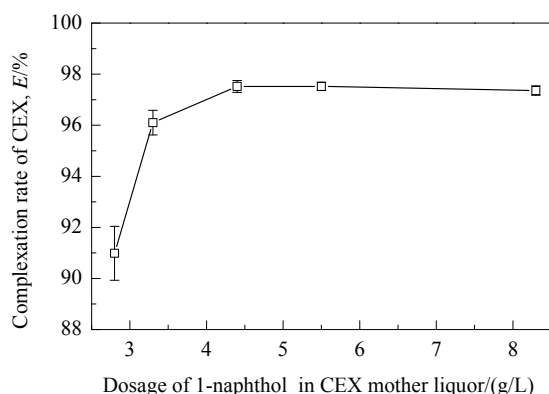


图 3 1-萘酚剂量对络合率的影响

Fig.3 Effect of 1-naphthol dosage on CEX complexation rate

### 3.2.3 pH 的影响

头孢氨苄的结构中同时存在羧基和氨基, 为两性化合物, 其等电点 pH=4.72, 因此 pH 值决定了头孢氨苄的存在形式. 在等电点 pH 时, 头孢氨苄为电中性, 在水中的溶解度最低; 当 pH 低于或高于等电点时, 头孢氨苄分子中的氨基正离子或羧基负离子逐渐增多, 头孢氨苄以带电形式存在, 在水中的溶解度逐渐增大<sup>[21,22]</sup>.

在络合温度 278 K 及 1-萘酚剂量为 4.4 g/L 的条件下, 考察 pH 值对头孢氨苄络合率的影响, 结果如图 4 所示. 可以看出, pH 值对头孢氨苄络合率的影响很大, 是影响络合反应的关键因素. pH 由 1 增至 2 时, 头孢氨

苄络合率急剧增大; pH 由 2 增至 7 时, 头孢氨苄络合率变化缓慢, 在等电点头孢氨苄的络合率达最大值 97.6%; pH>7 时, 头孢氨苄的络合率急剧下降. 头孢氨苄以两性离子形式存在, 即 1 个头孢氨苄分子中含 1 个羧基负离子和氨基正离子<sup>[14]</sup>. 在络合物沉淀中, 1 个头孢氨苄中的羧基官能团(氨基官能团)分别以氢键和静电作用与另外 2 个头孢氨苄分子中的氨基官能团(羧基官能团)结合, 最终形成二维结构. 当溶液 pH 值偏离头孢氨苄的等电点时, 越来越多的头孢氨苄以正离子或负离子形式存在, 破坏了这种二维结构, 导致头孢氨苄络合率降低. 因此, 头孢氨苄络合的最佳 pH 值为 4.72.

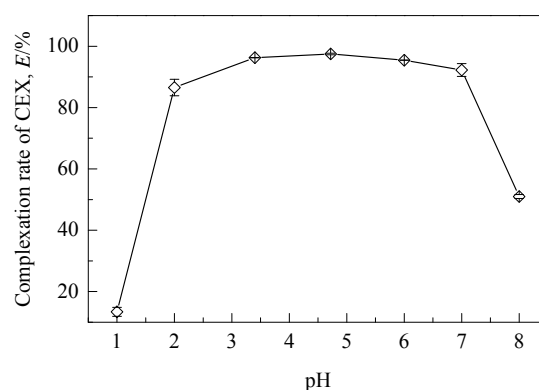


图 4 pH 对头孢氨苄络合率的影响

Fig.4 Effect of pH on CEX complexation rate

### 3.2.4 温度的影响

络合反应温度不仅影响过程能耗, 还是影响头孢氨苄稳定性的重要因素. 为考察温度对络合过程的影响, 在 pH=4.72 及 1-萘酚剂量为 4.4 g/L 的条件下, 测定了头孢氨苄在不同温度下络合率的变化, 结果如图 5 所示. 可以看出, 在 278~303 K 范围内, 温度变化对头孢氨苄络合率的影响很小. 因此, 从降低能耗的角度考虑, 络合反应宜在室温下进行.

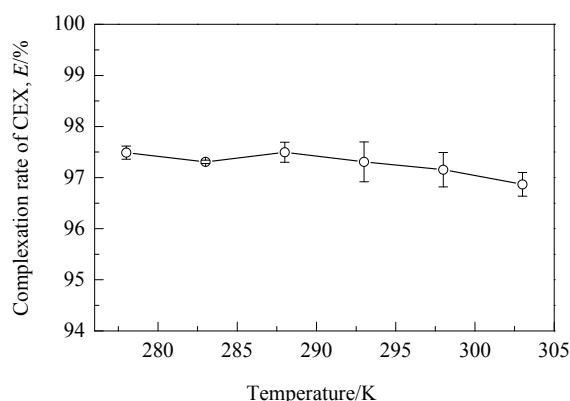
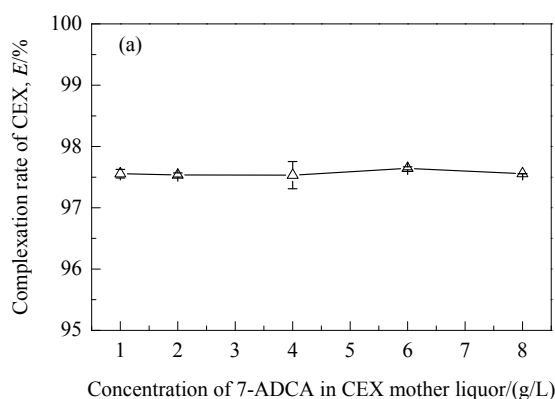


图 5 温度对络合率的影响

Fig.5 Effect of temperature on CEX complexation rate



### 3.2.5 7-ADCA, PGME 和 PG 浓度的影响

在头孢氨苄结晶母液中, 除头孢氨苄外, 还含有未反应的原料 7-ADCA 和 PGME 及副产物 PG 等物质, 其结构与头孢氨苄有相似性, 因此有必要研究这些物质对头孢氨苄络合率的影响. 图 6 为 7-ADCA, PGME 和 PG 单一物质对头孢氨苄络合率的影响. 可以看出, 当 7-ADCA, PGME 和 PG 单独存在于反应体系中时, 其对头孢氨苄络合率的影响很小, 表明以 1-萘酚为络合剂富集头孢氨苄具有高选择性. 在头孢氨苄的络合过程中, 络合剂只与头孢氨苄反应, 而不与其它底物和副产物反应<sup>[17]</sup>.

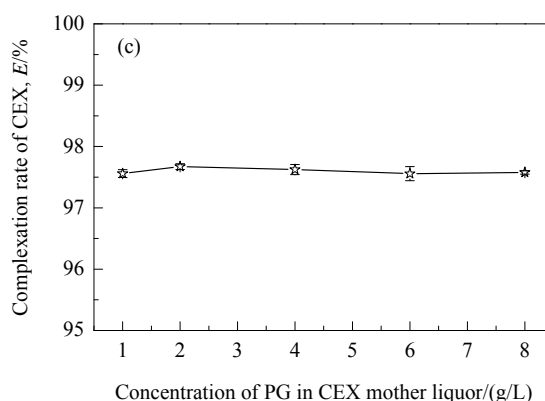
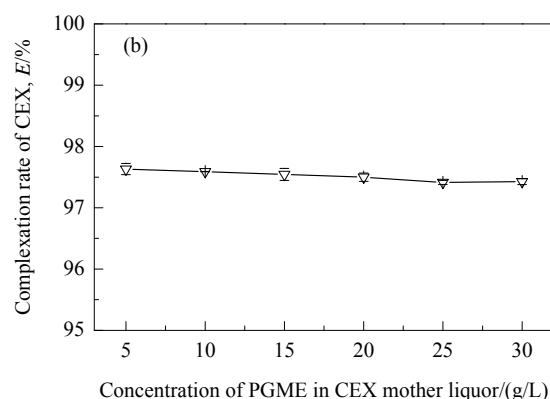


图 6 7-ADCA, PGME 和 PG 浓度对头孢氨苄络合率的影响

Fig.6 Effects of 7-ADCA, PGME and PG concentrations on CEX complexation rate

### 3.3 头孢氨苄最佳络合工艺

综上所述, 络合剂种类与剂量、pH 是影响头孢氨苄络合率的关键因素, 而温度及 7-ADCA, PGME 和 PG 浓度等因素对头孢氨苄络合率的影响很小. 最佳络合工艺为 1-萘酚为络合剂、1-萘酚剂量 4.4 g/L 及 pH=4.72、室温(293 K), 在此条件下平行进行 5 组络合反应实验, 头孢氨苄的络合率见表 2, 平均络合率为 97.41%.

### 3.4 头孢氨苄产品质量

在最佳络合工艺下制备头孢氨苄络合物沉淀, 采用

表 2 最佳工艺下头孢氨苄的络合率

Table 2 The complexation rate of CEX under the best parameters

No.	1	2	3	4	5	Average
Complexation rate, E/%	97.26	97.16	97.44	97.69	97.51	97.41

目前工业中应用的二氯甲烷解络合工艺, 考察回收得到的头孢氨苄的质量. 在络合物沉淀中加入水和二氯甲烷(体积比 1:3), 用 6 mol/L 硫酸溶液调节溶液 pH 至沉淀完全溶解, 1-萘酚进入二氯甲烷相, 头孢氨苄溶解于水相

中. 对富集了头孢氨苄的水相进行等电点结晶, 得头孢氨苄产品, 总收率为92.3%, 头孢氨苄含量为98.5%, 满足中国药典要求( $\geq 95\%$ )<sup>[23]</sup>. 头孢氨苄产品中的物质如

图7所示. 可以看出, 产品中不含残留原料7-ADCA和PGME及副产物PG, 1-萘酚残留量为0.009%, 满足中国药典要求( $\leq 0.05\%$ )<sup>[23]</sup>.

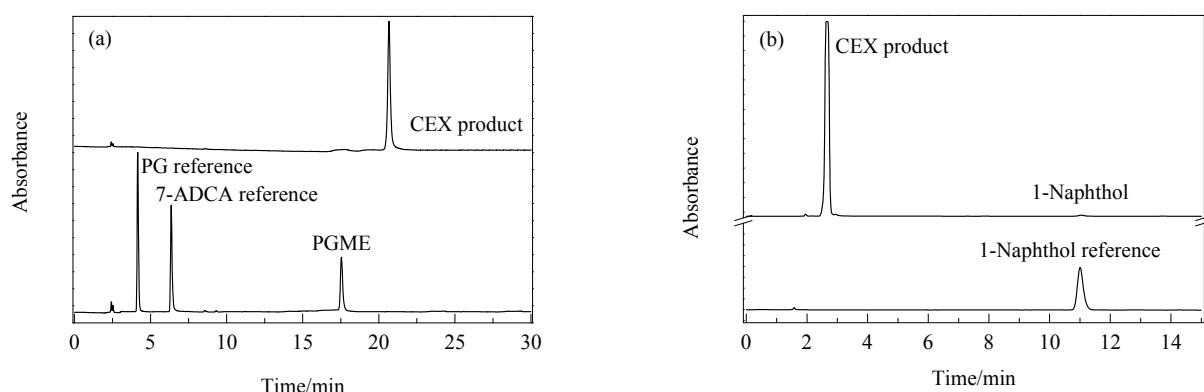


图7 结晶后头孢氨苄产品和7-ADCA, PGME, PG对照品及1-萘酚对照品的高效液相色谱

Fig.7 HPLC profiles of CEX product, 7-ADCA, PGME, PG and 1-naphthol references

## 4 结论

采用苯系和萘系化合物为络合剂, 研究了结晶母液中头孢氨苄的络合富集回收过程, 得到以下结论:

(1) 萘系化合物对头孢氨苄的络合率均高于苯系化合物. 以1-萘酚为络合剂获得了理想的络合率.

(2) 络合剂种类、剂量及 pH 是影响头孢氨苄络合率的关键因素, 而温度及 7-ADCA, PGME 和 PG 浓度对络合率的影响很小.

(3) 最佳络合工艺为络合剂1-萘酚、剂量4.4 g/L及 pH=4.72、室温(293 K), 此时头孢氨苄的络合率大于97.0%.

(4) 以二氯甲烷为解络合剂回收络合物沉淀中的头孢氨苄, 总收率大于92.0%. 头孢氨苄产品中, 头孢氨苄含量为98.5%, 1-萘酚含量为0.009%, 未检测到7-ADCA, PGME和PG等杂质, 产品质量符合药典要求.

### 参考文献

- [1] Hezave A Z, Esmailzadeh F. Investigation of the rapid expansion of supercritical solution parameters effects on size and morphology of cephalixin particles [J]. J. Aerosol Sci., 2010, 41(12): 1090–1102.
- [2] Wu H W, Feng Q Y, Yang H, et al. Modified biochar supported Ag/Fe nanoparticles used for removal of cephalixin in solution: characterization, kinetics and mechanisms [J]. Colloids Surf., A, 2017, 517: 63–71.
- [3] Basso A, Spizzo P, Toniutti M, et al. Kinetically controlled synthesis of ampicillin and cephalixin in highly condensed systems in the absence of a liquid aqueous phase [J]. J. Mol. Catal. B: Enzym., 2006, 39(1/4): 105–111.
- [4] Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance [J]. Environ. Sci. Technol., 2015, 49(11): 6772–6782.
- [5] Bruggink A, Roy P D. Industrial synthesis of semi-synthetic antibiotics: in synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001: 13–54.
- [6] Maladkar N K. Enzymatic production of cephalixin [J]. Enzyme Microb. Technol., 1994, 16(8): 715–718.
- [7] Illanes A, Anjarí M S, Altamirano C, et al. Optimization of cephalixin synthesis with immobilized penicillin acylase in ethylene glycol medium at low temperatures [J]. J. Mol. Catal. B: Enzym., 2004, 30(2): 95–103.
- [8] Al-Gheethi A A, Efaq A N, Mohamed R M, et al. Potential of bacterial consortium for removal of cephalixin from aqueous solution [J]. Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences, 2017, 24: 141–148.
- [9] Miao M S, Liu Q, Shu L, et al. Removal of cephalixin from effluent by activated carbon prepared from alligator weed: kinetics, isotherms, and thermodynamic analyses [J]. Process Saf. Environ. Prot., 2016, 104: 481–489.
- [10] Dutta N N, Saikia M D. Adsorption equilibrium of 7-aminodeacetoxy cephalosporanic acid-cephalexin mixture onto activated carbon and polymeric resins [J]. Indian J. Chem. Technol., 2005, 12(3): 296–303.
- [11] Shahriari S, Doozandeh S G, Pazuki G. Partitioning of cephalixin in aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycol) and sodium citrate salt at different temperatures [J]. J. Chem. Eng. Data, 2012, 57(2): 256–262.
- [12] Vilt M E, Winston Ho W S. Selective separation of cephalixin from multiple component mixtures [J]. Ind. Eng. Chem. Res., 2010, 49(23): 12022–12030.
- [13] Wang K Y, Chung T S. Polybenzimidazole nanofiltration hollow fiber for cephalixin separation [J]. AIChE J., 2010, 52(4): 1363–1377.
- [14] Kemperman G J, de Gelder R, Dommerholt F J, et al. Clathrate-type complexation of cephalosporins with  $\beta$ -naphthol [J]. Chem. Eur. J., 1999, 5(7): 2163–2168.
- [15] Nami N, Hoseyni S A, Sadatshahabi M, et al. Protection of environment by extraction of  $\beta$ -naphthol from cephalixin exit unit

- of antibiotic manufacture [C]//ICEBB. Singapore: IACSIT Press, 2012, 41: 108–111.
- [16] Li D C, Zhang Y W, Cheng S W, et al. Enhanced enzymatic production of cephalexin at high substrate concentration *in situ* product removal by complexation [J]. Food Technology and Biotechnology, 2008, 46(4): 461–466.
- [17] Kemperman G J, de Gelder R, Dommerholt F J, et al. Induced fit phenomena in clathrate structures of cephalosporins [J]. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 2000, 7(7): 1425–1429.
- [18] Kemperman G J, de Gelder R, Dommerholt F J, et al. Efficiency of cephalosporin complexation with aromatic compounds [J]. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 2001, 4(4): 633–638.
- [19] Schroën C G P H, Nierstrasz V A, Bosma R, et al. *In situ* product removal during enzymatic cephalexin synthesis by complexation [J]. Enzyme Microb. Technol., 2002, 31(2): 264–273.
- [20] Faarup P, Denmark F. Method of preparing a sparingly soluble complex of cephalexin: US4003896 [P]. 1977–01–18.
- [21] Hatanaka T, Morigaki S, Aiba T, et al. Effect of pH on the skin permeability of a zwitterionic drug, cephalexin [J]. Int. J. Pharm., 1995, 125(2): 195–203.
- [22] Wang K Y, Xiao Y C, Chung T S. Chemically modified polybenzimidazole nanofiltration membrane for the separation of electrolytes and cephalexin [J]. Chem. Eng. Sci., 2006, 61(17): 5807–5817.
- [23] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 二部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 285–286.
- National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Part 2 [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 285–286.