

唑啉头孢菌素(Cefazolin)的研制

南京药学院抗菌素研究室 无锡第三制药厂

Semisynthesis of Cefazolin

Research Laboratory of Antibiotics, Nanjing College of Pharmacy

The Wuxi No 3 Pharmaceutical Factory

提 要

本文的研制工作是在日本专利的基础上,直接采用发酵吸附洗脱液为开始原料,以对硝基苯甲酰氯为保护剂,以酰氯法代替混合酸酐法,进行合成,以适合于生产要求。

一、前 言

唑啉头孢菌素系头孢菌素类(我国称先锋霉素类)中的一个广谱抗菌素^[1-2]。于1969年由日本半合成,试用于临床,1970年进行临床总结,1971年生产,1974年美国 and 意大利相继生产。据了解,国内尚未正式生产。

唑啉头孢菌素在抗菌作用方面,对革兰氏阳性细菌较逊于先锋霉素Ⅱ号(Cephalexin),与先锋霉素Ⅰ号(Cephalothin)相似,但比先锋霉素Ⅳ号(Cephalexin)为强;对革兰氏阴性细菌的作用,则优于目前临床应用的所有先锋霉素类抗菌素。

唑啉头孢菌素在血液中有有效浓度可维持10小时左右,较现在应用的先锋霉素类抗菌素为长;在肝、胆方面的分布较其他先锋霉素类抗菌素为多;在胆汁中唑啉头孢菌素的浓度比氨苄西林高3.6倍,比先锋霉素Ⅰ号高12.78倍,比先锋霉素Ⅱ号高64.54倍。因而对肝、胆系统感染的疗效较好。

唑啉头孢菌素对由大肠杆菌及奇异变形杆菌所引起的肾盂肾炎治疗效果亦优于其他先锋霉素类抗菌素。

唑啉头孢菌素与青霉素、氨苄西林和先锋霉素Ⅱ号免疫交叉反应性很低,但对青霉素过敏患者使用时仍需谨慎。

为了广大劳动人民医疗的需要及填补国内空白,我院于1975年4月和无锡第三制药厂联合进行研制,5月底即研制成功。研制的产品与日本样品对照,通过熔点、元素分析、比旋

032138

度,薄层层析、纸层析、紫外、红外、抗菌谱和最低抑菌浓度及毫克效价等一系列的分析鉴定,结果与日本样品完全一致。目前正在放大试验,积累药理及临床的用量,为正式投产准备条件。此外还制备了对硝基苯甲酰氯、噻二唑及四氮唑乙酸三个中间体。

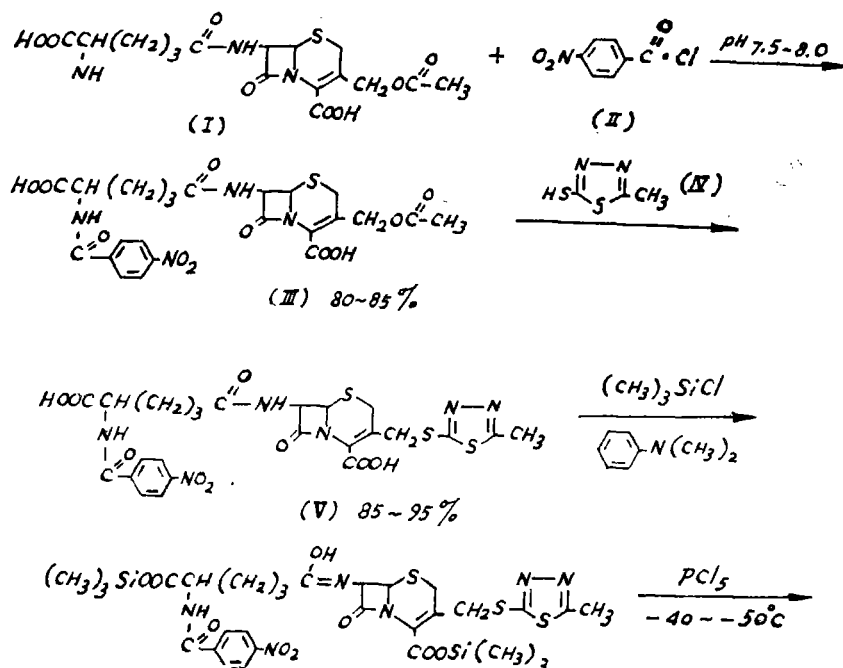
二、合成路线

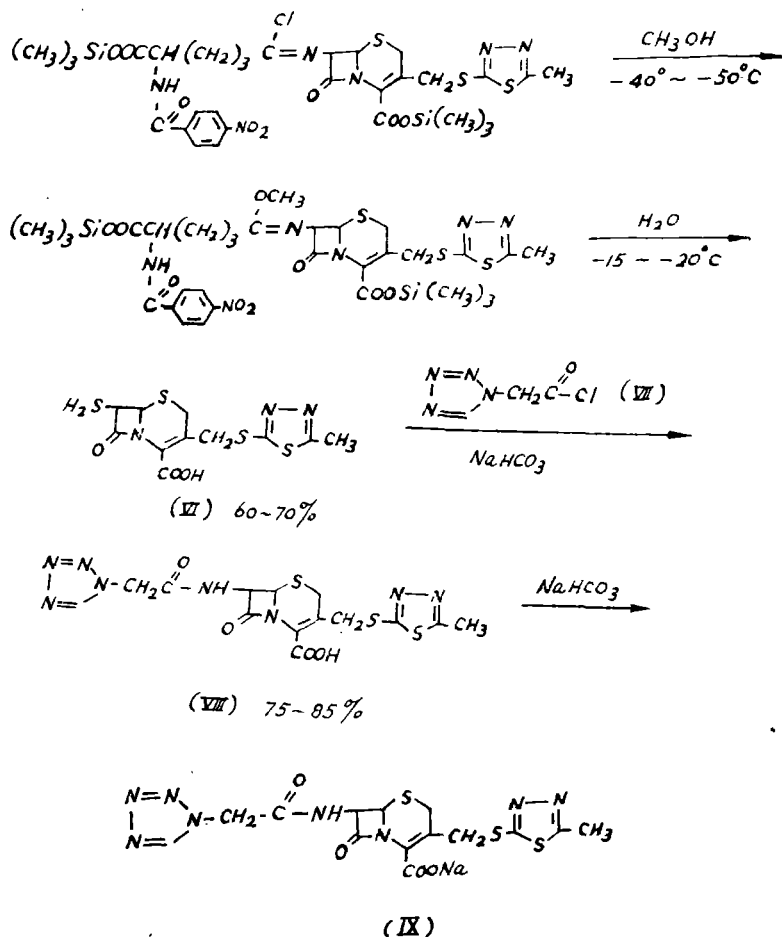
(一) 唑啉头孢菌素:

开始按日本文献〔3〕,以7-氨基头孢霉烷酸为开始原料,进行研制。因收率较低,改用日本专利〔4〕,以头孢菌素C钾结晶为开始原料,用氯代甲酸苄酯为保护剂,可以提高收率。但其缺点在于头孢菌素C需从发酵液中提取,氯代甲酸苄酯需用光气制备。后来我们在日本专利的基础上,直接采用发酵吸附洗脱液为开始原料,以西德专利〔5〕对硝基苯甲酰氯为保护剂。

将发酵吸附洗脱液中的头孢菌素C(I)结构中的氨基,用对硝基苯甲酰氯(II)保护,生成N-对硝基苯甲酰头孢菌素C(简称保护物)(III);以碳酸氢钠为缩合剂,与5-甲基-1,3,4-噻二唑-2-硫醇(简称噻二唑)(IV)缩合成7-[5-(对硝基苯甲酰基)-己二酸酰氨基]-3-[2-(5-甲基-1,3,4-噻二唑)-硫甲基]-3-头孢-4-羧酸(简称一缩物)(V);在N,N-二甲苯胺存在下,以三甲基氯硅烷酯化,五氯化磷氯化,甲醇醚化然后水解生成7-氨基-3-[2-(5-甲基-1,3,4-噻二唑)-硫甲基]-3-头孢-4-羧酸(简称裂解物)(VI);最后以碳酸氢钠为缩合剂与1H-四氮唑-1-乙酰氯(简称四氮唑乙酰氯)(VII)缩合成7-[1-(1H)-四氮唑乙酰氨基]-3-[2-(5-甲基-1,3,4-噻二唑)硫甲基]-3-头孢-4-羧酸即唑啉头孢菌素游离酸(VIII),再以碳酸氢钠转成钠盐(IX)。

以化学反应式表示如下:





在研制过程中,为了利用国产原料,缩短工艺,我们作了以下的工作:

1. 直接用发酵吸附洗脱液为开始原料:根据国内资料^[6],提取头孢菌素C采用离子交换法,将发酵滤液通过酸化、吸附洗脱、浓缩和结晶,从发酵液计算,一般收率为30—50%。我们直接用发酵吸附洗脱液,以对硝基苯甲酰氯为保护剂,保护头孢菌素C结构中的氨基,可以得到以头孢菌素C钾结晶为原料、同样产量的N-对硝基苯甲酰头孢菌素C,一般收率可达80—85%。如从发酵液计算,也提高了收率,简化了工艺。

2. 在发酵吸附洗脱液与对硝基苯甲酰氯缩合中,是将对硝基苯甲酰氯溶于丙酮,同时在发酵吸附洗脱反应液中也加入15%丙酮,反应后,室温下减压回收丙酮,操作不便,也很费时。我们改用醋酸乙酯代替丙酮,省去回收丙酮的操作,简化了生产工艺。

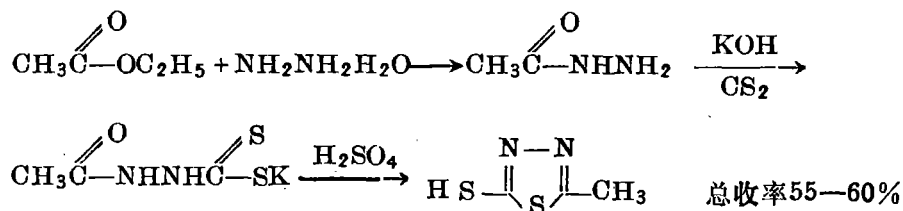
3. 文献中将头孢菌素C裂解,得到7-氨基头孢霉烷酸,先与四氮唑乙酰氯低温缩合,再与噻二唑在60℃反应5.5小时。由于在高温下,反应时间较长,最后一步收率只有25—30%。采用对硝基苯甲酰氯,保护头孢菌素C结构中的氨基后,与噻二唑在80℃反应35分钟,收率可达85—95%,缩短了反应时间,提高了三倍以上收率。

4. 文献中从头孢菌素C,经两步缩合,分别得到保护物及一缩物,现两步合为一步,简化了工艺,提高了收率。

(二) 噻二唑: [7]

醋酸乙酯与水合肼反应, 得到乙酰肼, 在氢氧化钾溶液中与二硫化碳反应生成N-乙酰肼基二硫代甲酸钾, 再与浓硫酸作用, 环合成噻二唑。

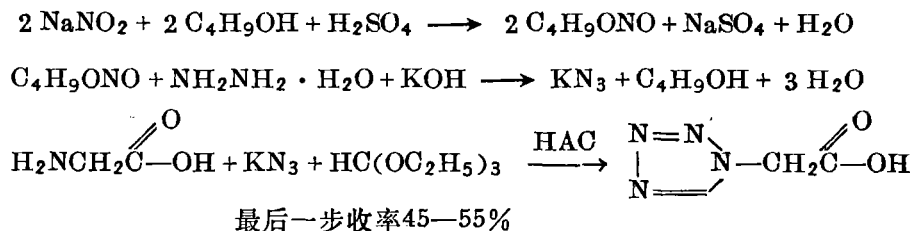
以化学反应式表示如下:



(三) 四氮唑乙酸:

先制备亚硝酸丁酯^[8], 后制备叠氮化钾^[9], 再制备四氮唑乙酸^[10]。

以化学反应式表示如下:



三、实 验 部 分

(一) 噻啉头孢菌素的合成:

1. 一缩物的制备(V)

将发酵吸附洗脱液1500ml (4733 γ/ml, 0.0171克分子), 冷却至5~10℃, 加入醋酸乙酯 150ml, 用10%氢氧化钠溶液, 调 pH7.5~8.0, 在搅拌下, 交叉加入对硝基苯甲酰氯醋酸乙酯溶液 (对硝基苯甲酰氯6.3克, 0.034克分子, 溶于无水醋酸乙酯 10ml) 和10%氢氧化钠溶液, 控制pH7.5~8.0, 直至反应液 pH不变后, 以20%硫酸酸化至pH2, 醋酸乙酯提取, 提取液以活性炭处理, 用饱和氯化钠溶液洗涤, 转入5%醋酸钠溶液约60—70ml, 控制pH4.8~5.2, 再酸化, 以醋酸乙酯提取, 转入4.6%碳酸氢钠水溶液 90ml 中, 再以碳酸氢钠调pH7.4~7.5, 投入噻二唑2.2克 (0.0167 克分子), 在内温80℃搅拌35分钟, 迅速冷却至10℃以下, 以6 N. 盐酸调 pH5.5, 用醋酸乙酯洗涤, 分取水层, 再用6 N. 盐酸调pH 1.0—1.5, 以醋酸乙酯和丙酮 (10:1) 混合液提取, 无水硫酸镁干燥, 在40℃以下减压浓缩至干, 得橙黄色粉末8.2克, 收率75.36%。

2. 裂解物的制备(VI)

在无水条件下, 将一缩物粉末8.2克 (0.0128克分子), 混悬在二氯甲烷 100ml, 在搅拌下, 依次加入N,N-二甲基苯胺 (C.P.) 12.5ml 及三甲基氯硅烷 14.3ml, 在水浴上回流加热 1 小时, 以液态氮或干冰, 冷却至-60℃左右, 加入五氯化磷 (C.P.) 5.4克 (0.025 克分子), -40~-50℃ 搅拌 2 小时, 再冷却至-60℃左右, 加入无水甲醇 (C.P.) 39ml, -40~-50℃ 搅拌 1 小时, 最后加入蒸馏水39ml, -10~-20℃ 搅拌 30 分钟, 在0—5℃用三乙胺调pH3.5, 在冰箱放置过夜, 过滤, 滤饼先后分别用蒸馏水, 丙酮及乙醚洗涤, 即得微

黄色裂解物粉末 3 克, 收率 67.7%。

3. 唑啉头孢菌素钠的制备(Ⅷ)

首先新鲜制备四氮唑乙酰氯。将四氮唑乙酸 3.08 克 (0.024 克分子), 加无水苯 24ml, 在搅拌下, 加入五氯化磷细粉 (C.P.) 10 克 (0.048 克分子), 室温搅拌 2.0~2.5 小时, 过滤, 滤饼用无水苯充分洗涤后, 溶解于冷的无水丙酮 24ml 中。

其次将裂解物 3.44 克 (0.01 克分子) 混悬于蒸馏水 50ml 及丙酮 35ml 的混合液中, 在搅拌下, 加入碳酸氢钠 (C.P.) 1.28 克, 直至完全溶解, 冷却至 $-3 \sim 0^{\circ}\text{C}$, 交叉滴加上述新鲜制备的四氮唑乙酰氯丙酮溶液和饱和的碳酸氢钠溶液, 控制 pH 7.0~7.5, 滴加完后, 在 $0 \sim 5^{\circ}\text{C}$ 搅拌 1 小时, 15°C 搅拌半小时, 用甲苯洗涤, 以 5% 盐酸调 pH 2, 醋酸乙酯提取, 在 40°C 以下减压浓缩至干, 得微黄色唑啉头孢菌素酸粗品 3.5 克, 收率 77.2%, 用大网格树脂 (Amberlite XAD-8) [11] 精制得白色结晶 1.05 克, 收率 28—35%, 熔点 $198 \sim 201^{\circ}\text{C}$ (分解)。

将唑啉头孢菌素酸 2.93 克 (0.00644 克分子) 碳酸氢钠 0.52 克 (0.0062 克分子), 加蒸馏水 6ml 溶解, 加入 0.2% 活性炭过滤, 然后向滤液中加入无水乙醇 28ml, 振摇溶解, 立即析出白色针状结晶, 置冰箱放置过夜, 过滤, 以无水乙醇洗涤, 经 P_2O_5 真空干燥, 得 2.5 克, 收率 81%。

(二) 噻二唑的制备:

将醋酸乙酯 (C.P.) 480 克 (5.44 克分子), 水合肼 (98%) 267.6 克 (5.34 克分子) 及无水乙醇 (C.P.) 100ml, 依次加入园底烧瓶中, 在水浴上回流加热 5 小时, 得乙酰肼乙醇溶液, 冷却, 加入氢氧化钾的甲醇溶液 (氢氧化钾 C.P. 338.4 克, 6 克分子, 溶于甲醇 1920ml 中), 滴加二硫化碳 336ml, 6.62 克分子, 其滴加速度控制内温 25°C 左右, 滴加完后, 在 25°C 保温搅拌 1 小时, 冷却, 静置, 过滤, 无水乙醇洗涤, 得 N-乙酰肼基二硫代甲酸钾, 低温干燥, 得微黄色粉末 731 克, 收率 70%。

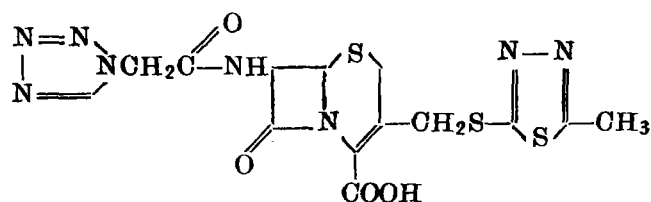
将上述干燥粉末, 分次加入装有搅拌的 -5°C 以下的浓硫酸 (C.P.) 1874ml 中, 控制温度不超过 5°C , 反应完毕后, 将反应物在搅拌下逐渐倾入到大量碎冰中, 过滤, 滤饼以大量冰水洗去酸, 低温真空干燥, 得白色粉末 412 克, 收率 80.2%, 熔点 $179 \sim 184^{\circ}\text{C}$ 。

(三) 四氮唑乙酸的制备:

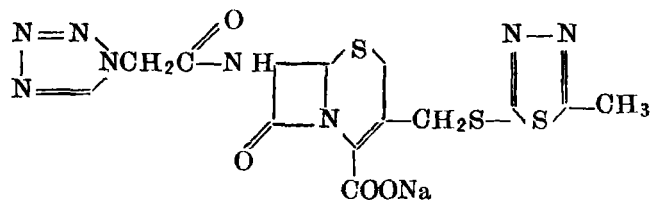
将甘氨酸 (C.P.) 69 克 (0.92 克分子), 叠氮化钾 89.4 克 (1.10 克分子) 和原甲酸乙酯 (沸点 $142 \sim 146^{\circ}\text{C}$) 232ml (1.39 克分子) 混合均匀, 在搅拌下加入冰醋酸 (C.P.) 450ml, 在水浴上加热控制内温 80°C , 搅拌反应 2 小时, 反应完毕, 冷却, 加入浓盐酸 (C.P.) 92ml, 搅拌 5—10 分钟, 减压蒸去冰醋酸, 残留物先用醋酸乙酯在沸腾下提取多次, 残渣再加入氯化钠研磨成颗粒, 以沙氏提取器用醋酸乙酯浸提, 合并前后的提取液, 以活性炭处理, 减压浓缩至小体积得白色结晶 53 克, 收率 45%, 熔点 $125 \sim 127^{\circ}\text{C}$ 。

四、质 量 分 析

样品: 游离酸, 钠盐。



唑啉头孢菌素游离酸



唑啉头孢菌素钠

(一) 熔点: 游离酸

文 献 ^[3]	日 本	自 制
198~200℃ (d)	198~201℃ (d)	198~201℃ (d)

混合熔点: 198~201℃ (d)

(二) 元素分析: 游离酸 $C_{14}H_{14}O_4N_8S_3$

元素名称	文 献 ^[3]		日 本 ^{1,2,3,4}	自 制
	计算值	实验值		
C	36.99	36.99	36.72, 36.83	36.98, 36.82
H	3.10	3.04	3.12, 3.26	3.16, 3.23
N	24.66	24.37	24.48, 24.39	24.40, 24.36

(三) 比旋度与pH:

文 献 钠 盐 ^[1]	自 制 钠 盐
$[\alpha]_D^{20} = -18 \sim -22$	$[\alpha]_D^{20} = -18$
pH = 4.5~6.5 (100mg/ml)	pH = 5.2

(四) 层析:

(1) 薄层层析: 硅胶板

溶媒系统: 正丁醇:冰醋酸:水=6:3:2

显色剂: 1%KMnO₄: 5%Na₂CO₃=1:1

实验平均值:

样品	①日本游离酸	②自制游离酸	③日本钠盐	④自制钠盐
R _f	0.70~0.72	0.66~0.71	0.70~0.71	0.71~0.71

(2) 纸层析:

溶媒系统: 正丁醇:冰醋酸:水=5:1:4 (上层)

显色剂: 1%KMnO₄: 5%Na₂CO₃=1:1

实验平均值:

样品	①	②	③	④
R _f	0.50~0.53	0.50~0.53	0.50~0.57	0.53~0.58

板层或纸层混合点样后, 都显一个点。

(五) 紫外吸收光谱: 游离酸或钠盐

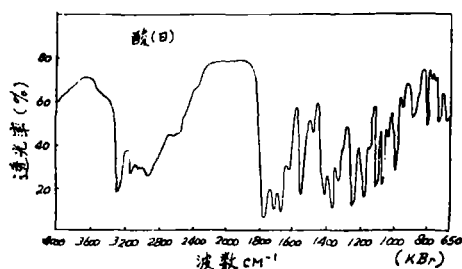
文 献 ^[3]	日 本	自 制
$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 272nm	272nm	272nm

唑啉头孢菌素钠的 E_{1%}^{1cm}:

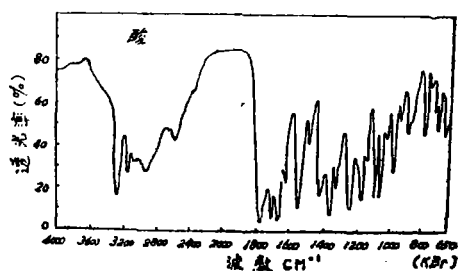
文 献 要 求 ^[1]	日本钠盐	自制钠盐
E _{1%} ^{1cm} (272nm) 264~292	265.4	266.6

(六) 红外吸收光谱:

自制游离酸与日本游离酸谱形完全一致。

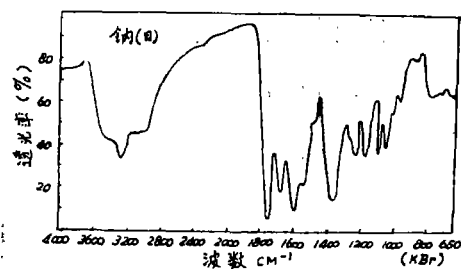


日本游离酸

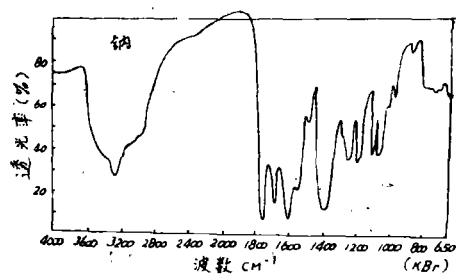


自制游离酸

自制钠盐与日本钠盐谱形完全一致。



日本钠盐



自制钠盐

(七) 抗菌谱及最低抑菌浓度试验比较:

MIC(γ /ml) 试验菌	日本钠盐	自制钠盐	自制游离酸	文献钠盐
金黄色葡萄球菌209p	0.2	0.2	0.2	0.39
枯草杆菌6633	0.2~0.39	0.2~0.39	0.2	0.39
八迭球菌	0.2~0.39	0.2~0.39	0.2~0.39	0.78
大肠杆菌50	0.78	0.78~1.56	0.78~1.56	1.56
伤寒杆菌	1.56	1.56~3.12	1.56	1.56
弗氏痢疾杆菌	2.12	3.12	3.12	1.56
变形杆菌0×19	25	25	12.5~25	随菌株不同而异
绿脓杆菌138	>100	>100	>100	>100

注: 文献中^[2]某些菌株号与我们不同, 我们所用的菌株为本室保存菌种。

(八) 效价测定:

(1) 标准品: 暂用自制唑啉头孢菌素游离酸, 其熔点、元素分析、层析、紫外、红外及最低抑菌浓度等, 皆与日本文献或日本样品一致。

(2) 按日本抗生物制品基准介绍中^[1], 效价测定法, 唑啉头孢菌素钠盐要求 $\geq 860 \gamma/\text{mg}$ 以上。

钠盐效价测定结果

样 品	毫 克 效 价
日 本 商 品 钠 盐	895 γ /mg
自 制 钠 盐	908 γ /mg

根据以上情况, 自制唑啉头孢菌素与日本进口样品质量完全一致。

大网格树脂 Amberlite XAD-8 承上海医药工业研究院化工室支援, JKS-30 承华北制药厂支援, 红外吸收光谱、紫外吸收光谱及元素分析由本院分析化学教研组及药物分析教研组代测, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 日本抗生物质医药品基准介说 479、525、812页, 1971
- [2] Nishida M et al: J Antibiotics 23:137, 1970
- [3] Kariyone K et al: ibid 23:131, 1970
- [4] Hattari K et al: Ger offen 2,332,045, 1974, Japon Kokai 74—24997, 1974
- [5] Oppici E et al: Ger offen 2,458,554, 1975
- [6] 上海化工学院、上海三药厂、上海四药厂: 抗菌素生产工艺学(下册) 96页, 1974
- [7] Kasiyone K et al: Ger Offen 2,162,324, 1972
- [8] A.H. 勃拉特立编: 有机合成 第二集 74页, 1964
- [9] Conard Ferneliur W 等: 无机合成 第二卷 119页, 1959
- [10] Takashi, Kamiya: Ger Offen 2,147,023, 1973
- [11] Dale W Blackburn: Ger Offen 2,502,047, 1975, 日本公开特许公报 特开昭 50-106996, 1975

更正:

第2页上化学反应式(I)中 $\overset{|}{N}H$ 应改为 NH_2 。

第3页上化学反应式(VI)中 H_2S 一 应改为 H_2N —。