

# 头孢母核 7-ACCA 的合成与表征

奚 强<sup>1</sup> 陈 建<sup>1</sup> 邝生鲁<sup>1</sup> 赵春芳<sup>2</sup>

(1. 湖北省新型反应器与绿色化工重点实验室, 武汉化工学院化工与制药学院, 湖北 武汉 430074;

2. 华中科技大学生命科学学院, 武汉 430074)

**摘 要:** 7-氨基-3-氯-3-头孢烯-4-酸(7-ACCA)是合成多种头孢菌素的重要中间体。文中以 3-氯代头孢二苯甲酯为起始物,经弱酸苯酚水解去 4 位二苯甲基和固定化青霉素 PGA-450 裂解去 7 位苯乙酰基两步反应制得 7-ACCA,两步总收率达 85.0% 以上。用 HPLC 测定其含量,产品 7-ACCA 质量分数达 99.0% 以上,略高于所购进标品。用红外、元素分析和核磁共振对 7-ACCA 进行了结构表征,结果表明,样品 7-ACCA 的分析结果与标准样品 7-ACCA 的结果一致。试验发现,去 4 位二苯甲基最佳反应温度为 60~65℃,去 7 位苯乙酰基的最佳温度为 30~32℃,最佳 pH 值为 9.0。在最佳反应条件下,进行了 400~450 批的批次实验,转化率和收率都无明显降低。本合成方法工艺简洁、产率高,所用试剂价廉易得,基本无污染。

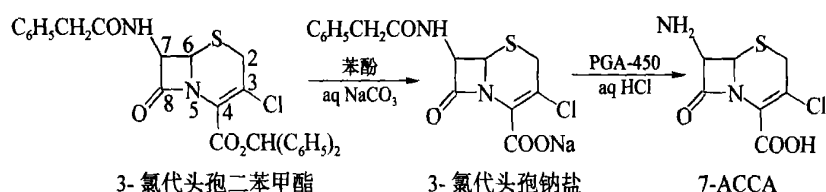
**关键词:** 头孢母核; 7-ACCA; 固定化青霉素

**中图分类号:** O626.32; TQ465.1

## 引 言

7-氨基-3-氯-3-头孢烯-4-酸(7-ACCA)是合成第三代头孢菌素头孢克洛(cefaclor)等的重要中间体。它是以青霉素为原料,对青霉素母核进行改造得到 C<sub>3</sub>-位功能化的 3-氯代头孢酯<sup>[1-2]</sup>,3-氯代头孢酯经过水解去 4 位酯保护基和裂解去 7 位苯乙酰基得到 7-ACCA。水解通常在酸性或碱性溶液中进行,裂解通常用化学方法除去 7 位苯乙酰基。化学裂解

法步骤复杂,要求低温,生产成本低,不易操作,同时严重污染环境;而固定化青霉素酰化酶裂解制备头孢母核,操作简单,条件温和,收率高,产品质量好,无环境污染,已在其它许多头孢母核的制备中得到采用<sup>[3-7]</sup>。本文以 3-氯代头孢二苯甲酯为起始物,用苯酚水解、固定化青霉素酰化酶 PGA-450 裂解制备 7-ACCA。本合成方法还未见有相关的文献报道,合成路线如下



## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

**仪器** 酶反应器, HPLC 检测仪, Agilent1100 series 型高效液相色谱仪, Nicolet FT-IR 光谱仪, Varian Inova-600 核磁共振仪。试剂 固定化青霉素酰化酶 PGA-450(市售), 3-氯代头孢二苯甲酯(自制), 苯酚(分析纯), 7-ACCA 标品(国外进口)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 去酯保护基** 向三口烧瓶中加入 3-氯代头孢二苯甲酯 5 g 和苯酚 30 g,于 0~65℃ 反应 6 h 后冷至 50℃ 加入乙酸乙酯继续冷至 10℃ 以下加入 1.8% 碳酸氢钠溶液萃取,收集萃取液,待用。

**1.2.2 去苯乙酰基** 向上述萃取液中加入固定化青霉素酶 PGA-450,将混合液加热到一定温度,用 10% 碳酸氢钠水溶液调 pH 值至 9.0,反应 3 h 左右,反应过程中滴加碳酸氢钠水溶液以维持反应液 pH 值在 9.0。反应毕,冷至室温,滤出 PGA-450,并用少许水洗滌,滤液和洗液冷却到 3~5℃,用盐调 pH 值至酸性后析出白色固体。过滤,干燥得 7-ACCA

收稿日期: 2005-08-20

第一作者: 博士,副教授

E-mail: xiqing.1964@yahoo.com.cn

白色结晶 (2.23 g, 98.5%)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 温度对去酯保护基反应的影响

头孢类化合物对温度较敏感, 温度过高易使  $\beta$ -内酰胺四元环破裂。通过实验发现去酯保护基反应在 60~65 为最佳。温度低于 60, 反应不完全; 温度高于 65, 有副反应发生, 使杂质增多, 增加后处理难度, 降低产率。

### 2.2 温度对去苯乙酰基反应的影响

将同一碳酸氢钠溶液萃取液分成 6 等份, 控制 pH 值为 9.0, 在 26, 28, 30, 32, 34, 36 温度下分别进行酶裂解反应, 结晶, 实验结果如表 1 所示。

表 1 温度对酶裂解反应收率的影响

Table 1 Effect of temperature on the yield of yeast

温度/	反应时间/ min	转化率/ %	收率/ %
26	90	97.6	85.0
28	65	97.4	85.3
30	45	97.7	85.4
32	40	98.3	86.8
34	38	98.1	86.6
36	25	98.4	86.4

注: 转化率、收率以 3-氯代头孢二苯甲酯计。

从表 1 中可以看出, 随着温度的升高, 反应时间逐渐缩短, 转化率和收率也有所提高。同时, 头孢化合物和固定化酶在 30~32 之间较稳定。所以, 反应温度在 30~32 为佳。

### 2.3 pH 值对去苯乙酰基反应的影响

将同一碳酸氢钠溶液萃取液分成 6 等份, 温度为 32 时, 在 pH 值为 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 的条件下分别进行酶裂解反应, 结晶, 实验结果如表 2 所示。

表 2 pH 值对酶裂解反应收率的影响

Table 2 Effect of pH on the yield of yeast

pH 值	反应时间/ min	转化率/ %	收率/ %
7.5	80	97.6	82.0
8.0	60	97.8	84.7
8.5	50	98.2	86.1
9.0	45	98.5	86.6
9.5	40	98.6	86.0
10.0	42	98.3	84.8

注: 转化率、收率以 3-氯代头孢二苯甲酯计。

从表 2 中可以看出, 随着 pH 值的升高, 反应时间逐渐缩短, 转化率和收率都有所提高, 但在 pH 为 9.0 时收率最高。保持反应液的 pH 值为 9.0 能使反应彻底进行, 从而提高收率。固定化青霉素酶在碱性条件下催化裂解反应, 在中性和酸性条件下催化化学合成反应, 固定化青霉素酶催化裂解反应时, pH 为 8.5~9.0 时活性最高。另外, 头孢类化合物中  $\beta$ -内酰胺环在强酸或强碱条件下易开环。综合上述因素, 最适宜反应的 pH 值为 9.0。

### 2.4 批次实验

以碳酸氢钠溶液萃取液为起始物 (3-氯代头孢钠盐含量用 HPLC 检测), 在最佳反应条件 (32、pH 值为 9.0) 下, 起始反应时间为 40 min 左右, 进行批次实验, 结果如表 3 所示。

表 3 最佳反应条件下批次实验结果

Table 3 Batch results under the best reactive conditions

反应批次	平均反应时间/ min	转化率/ %	收率/ %
1~90	40	98.5	97.6
91~180	72	98.1	97.1
181~270	95	98.2	96.8
271~360	109	97.8	96.7
361~450	116	97.9	97.1
451~540	125	97.1	96.0

注: 转化率、收率以 3-氯代头孢钠盐计。

从表 3 中可以看出, 前 450 批的转化率和收率都较高, 反应时间在 120 min 以内。450 批后, 反应时间延长, 转化率和收率均有所下降。此时适当提高反应温度和 pH 值可以再增加 50 批次左右。

## 3 标题化合物的含量测定和结构表征

### 3.1 含量测定

采用 HPLC 测定 7-ACCA 的质量分数, HPLC 分析条件为: 色谱柱 YMC AM-312 ODS (6.0 LD  $\times$  150 mm); 流动相 0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液; 流速 2.5 mL/min; 检测波长 254 nm, 测试结果见图 1 和图 2。

由图 1, 2 可知, 7-ACCA 的保留时间为 3.5 min 左右。以日本进口标准样品 7-ACCA 质量分数为 99.0%, 自制样品 7-ANCA 质量分数为 99.4%, 略高于标准样品的 7-ACCA。

### 3.2 结构表征

3.2.1 红外谱图 采用 Nicolet FT-IR 光谱仪对 7-

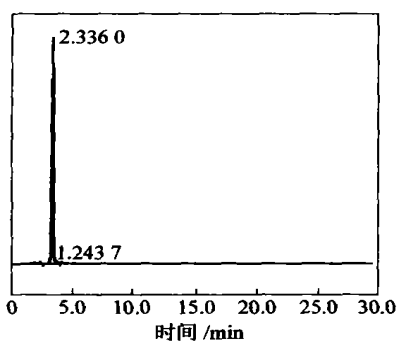


图 1 标品 7-ACCA 的 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC spectrum of standard 7-ACCA

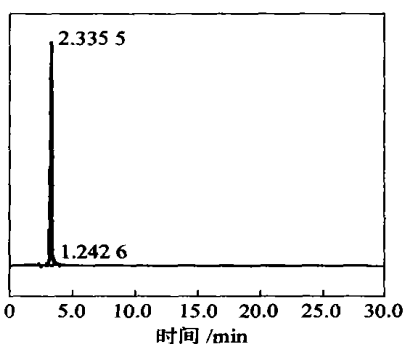


图 2 样品 7-ACCA 的 HPLC 谱图

Fig. 2 HPLC spectrum of sample 7-ACCA

ACCA 进行红外结构测定 (KBr 压片), 在此测定条件下分别测定了标品 7-ACCA 和自制样品 7-ANCA 的红外结构, 结果如图 3, 4 所示。

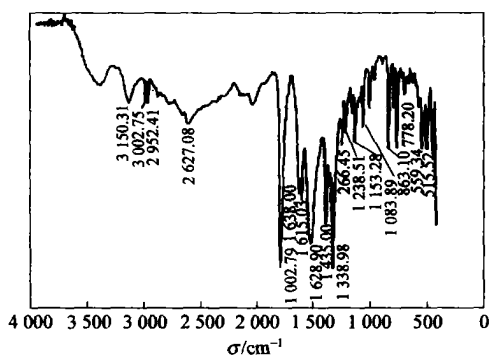


图 3 标品 7-ACCA 的红外谱图

Fig. 3 IR spectrum of standard 7-ACCA

从图 3, 4 可以看出, 标品 7-ACCA 和样品 7-ACCA 的红外谱图几乎完全一致。其特征峰数据为: IR (KBr) /  $\text{cm}^{-1}$ , 3 430 (  $\text{N-H}$  ), 3 150 (  $\text{N-H}$  ), 1 803 ( -内酰胺  $\text{C=O}$  ), 1 615 ( 羧酸  $\text{C=O}$  ), 682 (  $\text{C-S}$  )。

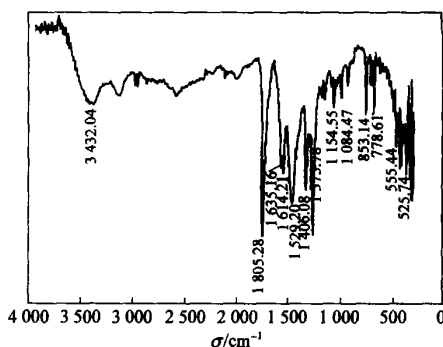


图 4 样品 7-ACCA 红外谱图

Fig. 4 IR spectrum of sample 7-ACCA

3. 2. 2 元素分析 标品元素分析  $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$ , 标品中各元素的质量分数 (%) 为: (理论值/ 测量值) C 35. 83/ 35. 10, H 3. 01/ 3. 78, Cl 15. 11/ 15. 38, N 11. 94/ 12. 02。

样品元素分析  $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$ , 样品中各元素的质量分数 (%) 为: (理论值/ 测量值) C 35. 83/ 35. 08, H 3. 01/ 3. 18, Cl 15. 11/ 15. 48, N 11. 94/ 12. 00。

3. 2. 3 核磁共振谱图 用 Varian Inova-600 核磁共振仪测定了标品和样品的  $^1\text{H}$  谱。7-ACCA 难溶于大多数溶剂, 但它的钠盐易溶于水, 故分别将标品和样品制成其钠盐, 以  $\text{D}_2\text{O}$  为溶剂进行测定。这样,  $-\text{COOH}$  中的 H 被 Na 所取代,  $-\text{NH}_2$  中的 H 被 D 交换掉, 在  $^1\text{H}$  谱图中就不会出现它们的特征峰。其谱图如图 5, 6 所示。从图 5, 6 可以看出标品 7-ACCA 和样品 7-ACCA 的  $^1\text{H}$  谱图几乎完全一致,

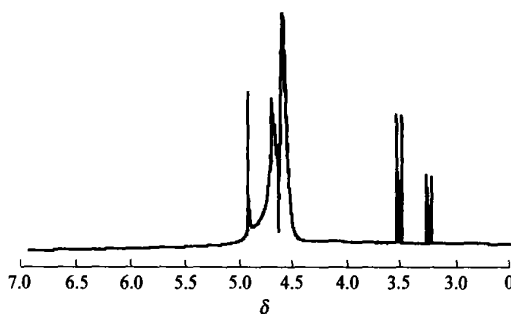
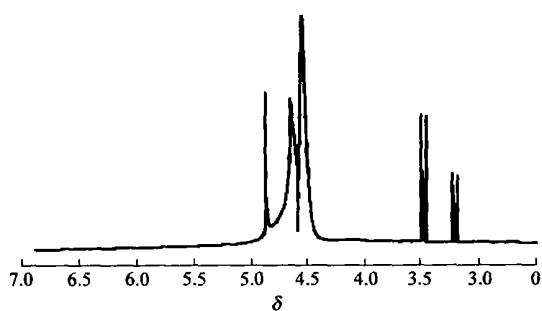


图 5 标品 7-ACCA 的  $^1\text{H}$ -NMR 谱图

Fig. 5  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of standard 7-ACCA

数据为:  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ), 3. 38 (d,  $J = 17. 4$  Hz, 1H, 6-H), 3. 75 (d,  $J = 15. 6$  Hz, 1H, 7-H), 4. 96 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{S}$ )。

图 6 样品 7-ACCA 的<sup>1</sup>H-NMR 谱图Fig. 6 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of sample 7-ACCA

## 参 考 文 献

- [1] Mitsuru Yoshioka. Synthetic studies related to oral  $\beta$ -lactam antibiotics[J]. Pure & Appl Chem, 1987, 59(8): 1401 - 1406
- [2] 张越, 吴鹏程. C<sub>3</sub>-氯代头孢烯酸及其衍生物合成[J]. 精细与专用化学品, 2003(8): 16 - 17
- [3] 刘姝晶, 陈耀祖. 头孢菌素 C<sub>3</sub>-位功能化及合成中间体的研究进展[J]. 国外医药抗生素分册, 1999, 20(6): 241 - 245
- [4] Hamashima Takami. Process for preparing aminohydroxycephamcarboxylates[P]. USA, 4647658. 1987-03-03
- [5] Kasche V, Haufler U, Riechmann L. Equilibrium and kinetically controlled synthesis with enzymes: semisynthesis of penicilline and peptides[J]. Methods Enzymol, 1987, 136: 280 - 292
- [6] Hyun C R, Kim J H, Ryu D D Y. Enhancement effect of water activity on enzymatic synthesis of cephalixin[J]. Biotechnol Bioeng, 1993, 42: 800 - 806
- [7] Yang Liu, Wei Dongzhi, Xue Ping, *et al.* Kinetically controlled synthesis of cefaclor using penicillin G acylase [J]. Journal of Molecular Catalysis (China), 2003, 17(2): 81 - 87

## 4 结 论

以 3-氯代头孢二苯甲酯为起始物,经水解去 4 位二苯甲基和固定化青霉素酶(PGA-450)裂解去 7 位苯乙酰基两步反应成功制得头孢母核 7-ACCA, 产品 7-ACCA 质量分数达 99.0% 以上,两步总收率达 85.0% 以上。去 4 位二苯甲基最佳反应温度为 60~65<sup>o</sup>,去 7 位苯乙酰基的最佳温度为 30~32<sup>o</sup>,最佳 pH 为 9.0。在最佳反应条件下,进行了 400~450 批的批次实验,转化率和收率都无明显降低。

## Synthesis and characterization of cephalosporin nucleus 7-ACCA

XI Qiang<sup>1</sup> CHEN Jian<sup>1</sup> KUANG Sheng-lu<sup>1</sup> ZHAO Chun-fang<sup>2</sup>

(1. Hubei Key lab of Novel Reactor and Green Chemical Technology, Wuhan Institute of Chemical Technology, Hubei Wuhan 430074;

2. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430074, China)

**Abstract:** 7-amino-3-chloro-cephem-3-en-4-acid (7-ACCA) is an important intermediate in preparation of cephalosporin. The process for preparing 7-ACCA using 3-chloro cephalosporin as a raw material via two reactions of hydrolyzation and enzyme cleavage was described. The total yield was up to 85.0%. The product was assayed by HPLC, and the content was up to 99%, greater than that of the standard 7-ACCA. The product was also characterized by IR, element analysis, and NMR, and the results of the sample 7-ACCA was consistent with that of the standard 7-ACCA. It is found that the optimum temperature of hydrolyzation reaction is 60~65<sup>o</sup>, the optimum temperature of enzyme cleavage reaction is 30~32<sup>o</sup> and the optimum pH is 9.0. Under the best reactive conditions, a batch experiment was carried out for 400~500 times, and the yield did not reduce evidently. The preparation procedure is efficient, the yield is high, the reagents used are cheap, and convenient to get with low pollution, and it is very easy to be industrialized.

**Key words:** cephalosporin nucleus; 7-ACCA; immobilized penicillin acylase

(责任编辑 曾宪玉)