

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

181731

Bejelentés napja: 1980. IX. 10. (2214/80)

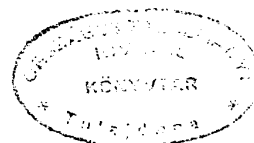
Japán elsőbbsége:
1979. IX. 11. (54-117030)

Közzététel napja: 1983. I. 28.

Megjelent: 1985. IV. 30.

Nemzetközi osztályozás:

NSZO₃:
B 01 D 15/08,
C 07 D 499/44



Feltalálók:

Nakamura Etsumi vegyész, Osaka-fu, Suzuki Takashi vegyész, Hyogo-ken,
Yanagida Tadasu vegyész, Osaka-fu, Yamamura Minehiko vegyész, Hyogo-ken,
Japán

Szabadalmaz:

Tanabe Seiyaku Co., Ltd.,
Osaka-fu, Japán

Eljárás 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metil-karbamoil-propionamido)- -2-p-hidroxi-fenil-acetamido]-penicillánsav tisztítására

1

2

A találmány tárgya eljárás 6-[2-(D-2-amino-3-N-metil-karbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsav (a továbbiakban „N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin”-nek nevezzük) tisztítására.

Az N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin felszintetikus penicillin, amely jelentékeny gátló hatással rendelkezik Gram-negatív és Gram-pozitív mikroorganizmusokkal szemben. Ismert, hogy az N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillint a 6-amino-penicillánsavnak vagy D-2-(D-2-amino-3-N-metil-karbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-ecetsavval való kondenzációja során (i) vagy amoxicillinnek D-2-amino-3-N-metil-karbamoil-propionsavval való kondenzációjával (ii) (4 053 609 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás) állítják elő. Az említett eljárások szerint előállított N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin azonban elkerülhetetlenül szennyezett, például melléktermékekkel vagy kiindulási anyagokkal, így a gyógyászatban való alkalmazás céljából tisztítani kell. Az említett szennyeződések pontosabban meghatározva a következők: D-2-(D-2-amino-3-N-metil-karbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-ecetsav [a továbbiakban (A) szennyeződésnek nevezzük], penicillsav [a továbbiakban (B) szennyeződésnek nevezzük], penicillsav és N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin kondenzációs terméke [a továbbiakban (C) szennyeződésnek nevezzük] és ismeretlen szerkezetű színes anyagok [a továbbiakban (D) szennyeződésnek nevezzük]. Ezek a szennyeződések az (i) alatt említett eljárás szerint előállított termékekben vannak jelen. Az

(ii) alatt említett eljárással előállított N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillinben a (B), (C) és (D) szennyeződések, valamint amoxicillin [a továbbiakban (E) szennyeződésnek nevezzük] vannak jelen.

Ezideig a penicillineket és cefalosporinokat aktív szénrel vagy alumínium-oxiddal töltött oszlopon oszlopkromatográfiásan, ioncserélő gyantákkal (például Amberlite CG-400, Amberlite IRA-93, Diaion WA-21, Amberlite IR-45), ioncserélő poliszacharidokkal (például dietil-amino-etil-cellulóz) vagy Sephadex-szel tisztították. Mivel azonban az (A)-(E) szennyeződések fizikai tulajdonságai nagy mértékben hasonlóak az N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin tulajdonságaihoz, ezekkel az ismert módszerekkel a megfelelő tisztaságú termék eléréséhez szükséges mennyiségű szennyeződés nehezen távolítható el. Amennyiben például a nyers N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin tisztítását aktív szén oszlopon végezzük, a kívánt terméket csaknem az (A) vagy (E) szennyeződéssel egyidejűleg eluáljuk, majd ezt követően eluálható a (B) és (C) szennyeződés. A nyers N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillinnek gyenge anioncserélő gyantával való tisztítása során (például Diaion WA-10, Diaion WA-21, Amberlite IRA-93, Amberlite IR-45) az (A) vagy (E), valamint legtöbb esetben a (B), (C) és/vagy (D) szennyeződések a kívánt termék nagy részével együtt eluálódnak ki. Így tehát az aktív szén és a gyenge anioncserélő gyanták nem alkalmasak nagy tisztaságú N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin előállítására. Az alumínium-

-oxidál végzett oszlopkromatográfiás tisztítás során a (C) és (D) szennyeződések eltávolíthatók ugyan a nyers N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillinből, ugyanakkor ezzel a módszerrel az (A), (B) és (E) szennyeződések nem választathatók el. Erős anioncserélő gyantákkal elválaszthatók a (B), (C) és (D) szennyeződések a nyers N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillinből, az (A) vagy (E) szennyeződés ugyanakkor nem távolítható el. A Sephadex vagy ioncserélő poliszacharidok alkalmazásával szintén nem választathatók el a szennyeződések a nyers N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillinből. Ebben az esetben 1 g nyers N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin tisztításához (mintegy 80%-os tisztaság) 400–600 ml adszorbenst kell használni.

A találmány tárgya egyszerű és gyakorlatban alkalmazható eljárás az N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin tisztítására. A találmány tárgya továbbá eljárás N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin tisztítására, amelynek során nem poláros, makroporózus sztirol-divinilbenzol kopolimer adszorpciós gyantát alkalmazunk. A találmány tárgya továbbá eljárás az N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin szintézise során keletkező illetve jelenlevő szennyeződések eltávolítására. A találmány tárgya ezen kívül olyan eljárás kidolgozása, amellyel egyszerű adszorpciós-elúciós módszerrel nagy tisztaságú N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin állítható elő nagy kitermeléssel. Az alábbiakban ezeket az eljárásokat részletesen ismertetjük. Az 1. ábra az 1-(A) példa szerint előállított nyers N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin vizes oldatának nagy teljesítményű folyadékkromatogramját ábrázolja. A 2. és 3. ábra a 6-(A) példa szerint előállított nyers N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin nagy teljesítményű folyadékkromatogramjait mutatja be.

A találmányunk szerint a nyers N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillint a következő lépésekben tisztítjuk:

(A) az N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin vizes oldatát nem-poláros makroporózus sztirol-divinilbenzol kopolimer adszorpciós gyantával hozzuk érintkezésbe, és így az N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillint adszorbeáljuk a gyantán;

(B) az adszorbeált N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillint vízzel vagy víznek és valamilyen vízzel elegyedő szerves oldószernek az elegyével eluáljuk; majd

(C) a nyers N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillint izoláljuk az eluátumokból.

A találmány szerint 0,6–1,1 ml/g pórustérfogatú nem-poláros, makroporózus sztirol-divinilbenzol kopolimer (divinilbenzollal térhálósított polisztirol) adszorpciós gyantákat alkalmazunk. A gyanták fajlagos felülete előnyösen 200–800 m²/g, különösen 300–750 m²/g. Az alkalmazott nem-poláros, makroporózus gyanták szemcsemérete előnyösen 45–840 μ, különösen 70–370 μ. Ilyen kopolimerek például a következők: 0,890 ml/g pórustérfogatú, 501,3 m²/g fajlagos felületű és 280–370 μ szemcseméretű sztirol-divinilbenzol kopolimer (gyártja Mitsubishi Chemical Industries Ltd., márkaneve Diaion HP–10); 1,077 ml/g pórustérfogatú, 718,0 m²/g fajlagos felületű és 280–370 μ szemcseméretű sztirol-divinilbenzol kopolimer (gyártja Mitsubishi Chemical Industries Ltd., márkaneve Diaion HP–20);

2

0,990 ml/g pórustérfogatú, 570 m²/g fajlagos felületű és 280–370 μ szemcseméretű sztirol-divinilbenzol kopolimer (gyártja Mitsubishi Chemical Industries Ltd., márkaneve Diaion HP–30); 0,687 ml/g pórustérfogatú, 704,7 m²/g fajlagos felületű és 280–370 μ szemcseméretű sztirol-divinilbenzol kopolimer (gyártja Mitsubishi Chemical Industries Ltd., márkaneve Diaion HP–40); 0,692 ml/g pórustérfogatú, 300 m²/g fajlagos felületű és 280–840 μ szemcseméretű sztirol-divinilbenzol kopolimer (gyártja Rohm and Haas Co., márkaneve Amberlite XAD–2); 0,998 ml/g pórustérfogatú, 200 m²/g fajlagos felületű és 280–840 μ szemcseméretű sztirol-divinilbenzol kopolimer (gyártja Rohm and Haas Co., márkaneve Amberlite XAD–4). Az adszorpció és eluációs lépéseket találmány szerint végezhetjük szakaszosan, de előnyösen folyamatosan oszlopban hajtjuk végre.

A találmány szerinti adszorpciós lépést könnyen végrehajthatjuk úgy, hogy a nyers N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin vizes oldatát a nem-poláros, makroporózus sztirol-divinilbenzol kopolimer gyantával töltött oszlopon vezetjük át. A találmány szerint alkalmazott gyantát előzetesen vízben duzzasztjuk. Az alkalmazott gyanta térfogata a vizes oldatban levő N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin koncentrációjától illetve az oszlopon átvett vizes oldat térfogatától függően széles határok között változhat. Általában a vizes oldatban jelenlevő N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin 1 g-jára számítva előnyösen 3–100 ml, különösen 30–80 ml gyantát használunk. A vizes oldatot a gyantán előnyösen 0,1–5 óra⁻¹, különösen 0,3–2 óra⁻¹ térbességgel vezetjük át. Az adszorpciós lépést előnyösen 2–15 °C hőmérsékleten, különösen 4–6 °C hőmérsékleten hajtjuk végre. Az adszorpciós lépésben előnyösen 0,5–26 súly/térf%, különösen 10–15 súly/térf% N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin tartalmú vizes oldatot alkalmazunk. A vizes oldatokat ismert módon például úgy állítjuk elő, hogy a nyers N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillint feloldjuk vízben és kívánt esetben az oldhatatlan anyagok eltávolítására aktív szénnel kezeljük vagy szűrjük.

A találmány szerinti elúciós lépés könnyen végrehajtható vízzel vagy víznek és valamilyen vízzel elegyedő szerves oldószernek az elegyével. A gyantán adszorbeált N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin eluálását úgy hajtjuk végre, hogy 0,3–15 óra⁻¹, különösen 0,5–5 óra⁻¹ térbességgel vizet vagy víznek és valamilyen vízzel nem elegyedő szerves oldószernek az elegyét vezetjük át az oszlopon. Ebben az esetben először az (A) [vagy (E)] és (B) szennyeződések kerülnek először az eluátumba, még az N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin deszorpciója előtt, majd vízzel történő eluálással fokozatosan eluáljuk az N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillint. Így a kívánt terméket tartalmazó eluátumok illetve frakciók összegyűjtésével tiszta N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin-oldatot kapunk. Az N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillint tartalmazó eluátumok illetve frakciók könnyen megkülönböztethetők a szennyeződések tartalmazó eluátumoktól illetve frakcióktól, mivel az eluátumokban jelenlevő N'-metil-D-aszpariginil-amoxicillin 272 nm-en végzett ultrabolya abszorpcióval kimutatható. A leírásunk elején említett

(A)–(E) szennyeződések közül a (C) és (D) szennyeződések az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillinnek az oszlopról való eluálása, sőt az oszlopnak vízzel való mosása után is adszorbeálódva maradnak az oszlopon.

Amennyiben eluálószerként víznek és valamilyen vízzel elegyedő szerves oldószernek az elegyét alkalmazzuk, úgy az eluálószeret előnyösen 0,3–5 óra⁻¹, különösen 1–3 óra⁻¹ térbességgel vezetjük át az oszlopon. Ebben az esetben különösen előnyösen a vizes eleggyel történő eluálás előtt az oszlopot az (A) [vagy (E)] és (B) szennyeződések eltávolítása céljából vízzel mossuk. Ebben a mosási lépésben a vizet 0,1–5 óra⁻¹ térbességgel vezetjük át az oszlopon. A vízből és valamilyen vízzel elegyedő szerves oldószerből álló elegyként például a következők alkalmazhatók: víz és 1–4 szénatomos alkanol (például metanol, etanol), víz és 3–4 szénatomos alkanon (például acetone, metil-etil-ke-ton), víz és 2–4 szénatomos dialkileter (például dimetiléter, dietiléter), víz és 4 szénatomos ciklusos éter (például tetrahid-rofurán, dioxán), víz és 3 szénatomos N,N-dialkil-alkanoil-amid (például dimetil-formamid, dimetil-acetamid), víz és dimetil-szulfoxid elegye. A találmány szerint különösen előnyösen víz és 1–3 szénatomos alkanol elegyét alkalmazzuk. 15 térf./térf.% (különösen 2–8 térf./térf.%) vizes metanol és vizes etanol alkalmazásával nagy kitermeléssel, gyorsan eluálható az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin az oszlopról. A vizes eleggyel való eluálás során a (C) és (D) szennyeződések gyakorlatilag nem deszorbeálódnak.

Az elúciót bármely említett esetben, előnyösen 2–15 °C hőmérsékleten, különösen 4–6 °C hőmérsékleten hajtjuk végre. Amikor a sztírol-divinilbenzol kopolimer adszorpciós gyantán adszorbeálódott, nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillinnek vízzel vagy víznek és valamilyen vízzel elegyedő szerves oldószernek az elegyével történő eluálását végezzük, a nyers termékben levő (A) [vagy (E)] és (B) szennyeződések eluálódása az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin deszorpciója előtt végbemegy. A sztírol-divinilbenzol kopolimer adszorpciós gyantán már adszorbeálódott (C) és (D) szennyeződések még többször ismételt vízzel vagy víznek és valamilyen vízzel elegyedő szerves oldószernek az elegyével végzett eluálással sem távolíthatók el. Így tehát a kívánt vegyületet tartalmazó eluátumok illetve frakciók összegyűjtésével könnyen kapjuk az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin vizes oldatát, amely gyakorlatilag mentes a szennyeződésektől.

A fentiek szerint kapott vizes oldatból az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin izolálását ismert módon végezzük. Az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint például a vizes oldat koncentráálásával, fagyaszttva koncentráálásával, fordított ozmózissal való koncentráálásával, és/vagy liofilizálásával nyerjük ki nagy tisztaságban.

A találmány szerint az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin szintézise során keletkező illetve jelenlevő szennyeződések nem-poláros, makroporózus adszorpciós gyantán végzett egyszerű adszorpciós-elúciós eljárással nagy hatásokkal távolíthatók el. Mivel a találmány szerinti eljárás az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin bomlása nélkül végrehajtható, a

szennyeződésektől gyakorlatilag mentes terméket nagy kitermeléssel kapjuk.

Az alábbi kísérletek és példák közelebbről bemutatják találmányunkat, anélkül azonban, hogy azt bármilyen szempontból korlátoznák. A kísérletekben és a példákban a nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárást a következő feltételek mellett végezzük:

(A) oszlop

– rozsdamentes acél oszlop (150 mm x 4 mm)

töltet

– 5 µm szemcseméretű szilikagélhez kémiaiilag kötött oktadecil-triklór-szilán

mozgó fázis

– metanol/pH 5,5 foszfát-puffer (12,5/87/5

térf./térf.%)

áramlási sebesség

– 0,5 ml/perc

(B) A nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárást az (A) alatt leírt körülmények között hajtjuk végre, azzal az eltéréssel, hogy mozgó fázisként metanol/pH 5,5 foszfát-puffer 2,5/97,5 térf./térf.% arányú elegyét alkalmazzuk.

A (B) szennyeződés, azaz a penicillinsav kémiai szerkezete az (1) képletnek felel meg.

A (C) szennyeződés, azaz a penicillinsav és az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin kondenzációs termékének kémiai szerkezete az analitikai eredmények, mint az IR-spektrum, az UV-spektrum, az NMR-spektrum és az elemvizelés alapján a (2) képletnek felel meg.

Kísérletek

(A) Eljárás

Az 1–(A) példa szerint előállított nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin (tisztasága 79%) vizes oldatát a gyantával illetve az adszorbenssel töltött oszlopon vezetjük át. Az oszlopot ezután vízzel eluáljuk és az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint tartalmazó frakciókat összegyűjtjük. A frakciókban található szennyeződések, valamint az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin tisztaságát és kitermelését nagy teljesítményű folyadékkromatográfián vizsgáljuk az (A) feltételek mellett.

A gyanta illetve az adszorbensek

(I) sztírol-divinilbenzol kopolimer (pórustérfogata 1,077 ml/g, fajlagos felülete 718 m²/g, szemcsemérete 280–370 µ, gyártja Mitsubishi Chemical Industries Ltd., márkanéve Diaion HP–20).

(II) erős anioncserélő gyanta (trimetil-ammonium-csoporttal $[-N^+(CH_3)_3]$ helyettesített polisztirol, gyártja Rohm and Haas Co., márkanéve Amberlite CG–400).

(III) gyenge anioncserélő gyanta (divinilbenzol-akrildimetilaminoalkilamid kopolimer $[CH_2=CH-CONH(CH_2)_n-N(CH_3)_2]$, gyártja Mitsubishi Chemical Industries Ltd., márkanéve Diaion WA–10).

(IV) gyenge anioncserélő gyanta [dimetilamino-csoporttal $[-N(CH_3)_2]$ helyettesített polisztirol,

gyártja Rohm and Haas Co., márkanéve Amberlite IRA-93].

(V) gyenge anioncserélő gyanta [N-(poliiminoetilén)-aminoetil-csoporttal $[-CH_2NH(CH_2CH_2NH)_nH]$ helyettesített sztírol-divinilbenzol kopolimer, gyártja Mitsubishi Chemical Industries Ltd., márkanéve Diaion WA-21].

(VI) epiklórhidrinrel térhálósított dextrans gél (gyártja Pharmacia Fine Chemicals Co., márkanéve Sephadex G-10).

(VII) dietil-amino-etil-cellulóz

(VIII) alumínium-oxid.

(IX) gyenge anioncserélő gyanta (primer, szekunder és/vagy tercier amino-csoportokkal helyettesített polisztirol, gyártja Rohm and Haas Co., márkanéve Amberlite IR-45).

(B) Eredmények

Az eredményeket az 1. táblázat tartalmazza. A 20

A táblázatból látható, hogy a találmány szerinti eljárással az (A) és (B) szennyeződések az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin deszorpciója előtt az eluátumba kerülnek, a (C) és (D) szennyeződések pedig az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin vízzel való eluálása alatt a gyantán maradnak adszorbeálódva. Így csaknem kvantitatíve kapjuk meg a szennyeződések-től mentes N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint. A találmány szerinti eljárással ellentétben a (II), (III), (IV), (VI) és (VII) adszorbensek alkalmazásával az (A) szennyeződés nem választható el az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillintól, mivel a két vegyület csaknem egyidejűleg eluálódik. Az (V) anioncserélő gyanta alkalmazásával az (A), (B) és (C) szennyeződések az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillinnel együtt eluálódnak. A (IX) anioncserélő gyanta alkalmazása esetén az összes N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin és az (A)-(D) szennyeződések csaknem egyidejűleg eluálódnak.

1. táblázat

Gyanta illetve adszorbens	A frakciókban levő komponensek ⁺				Tisztaság ⁺⁺ (%)	Kitermelés ⁺⁺ (%)	
	N'-metil-D- aszpara- ginil-amoxi- cillin	Szennyeződések					
		A	B	C			D
(Találmány szerinti eljárás) (I)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	100	97,0
(Kontroll)							
(II)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	85,0	20,0
(III)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	93,0	18,6
(IV)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	95,0	52,3
(V)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	88,0	47,5
(VI)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	90,0	73,0
(VII)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	47,0	56,0
(VIII)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	87,0	37,0
(IX)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	81,0	86,0

Megjegyzés:

- * (+) a szóban forgó komponens az összegyűjtött frakciókban van
- (-) a szóban forgó komponens nincsen az összegyűjtött frakciókban
- ** az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin tisztaságát és kitermelését a következő frakciók összegyűjtésével határozzuk meg:

(I), (VI) és (IX)

az összes N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint tartalmazó frakció

(II), (III), (IV), (VII) és (VIII)

a (C) szennyeződés eluálása előtt kapott N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint tartalmazó frakciók

(V)

a (D) szennyeződés eluálása előtt kapott N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint tartalmazó frakciók

1. példa

(A) N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin szintézise

(1) 89,7 g D-2-(D-2-o-nitrofenil-szulfenilamino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-

ecetsavat és 20,2 g N-metil-morfolint feloldunk 1000 ml dimetil-formamidban és az oldathoz -25°C és -20°C közötti hőmérsékleten keverés közben hozzáadjuk 21,7 g klórhangyasavetilészter 200 ml tetrahidrofuranban készített oldatát. A reakcióelegyhez ezután -10°C és -8°C közötti hőmérsékleten hozzáadjuk 76,4 g 6-amino-penicillán-

sav-trietilamin-só 400 ml vízben készített oldatát és a reakcióelegyet 30 percig keverjük -5°C és 0°C közötti hőmérsékleten. Az így kapott pH-értékét ezután 5%-os vizes citromsav-oldattal 3-ra állítjuk be és a reakcióelegyet 1000 ml tetrahidrofuran és 500 ml etil-acetát elegyével extraháljuk. Az extraktumot vízzel mossuk, szárítjuk és 40°C alatti hőmérsékleten az oldószer eltávolítása céljából bepároljuk. A visszamaradó anyagot éterből kristályosítjuk. Sárga tűk formájában 133 g 6-[D-2-(D-2-o-nitrofenil-szulfenilamino)-2-N-metilkarbamoil-propionamido]-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat kapunk. Olvadáspont: $165-167^{\circ}\text{C}$ (bomlás)

$\text{IR}_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ (cm^{-1}): 3400, 3250, 1780, 1730, 1640

(2) 1000 ml metanol/tetrahidrofuran (4 : 1) elegyhez hozzáadunk 64,6 g (1) szerint előállított terméket és 27,4 g tiobenzamidot és a reakcióelegyet 40 percig keverjük szobahőmérsékleten. Az így kapott reakcióelegyet az oldószer eltávolítása céljából 30°C alatti hőmérsékleten bepároljuk. A visszamaradó anyagot feloldjuk 257,0 ml vízben, majd hozzáadunk 8,0 g aktív szén és a reakcióelegyet keverjük. A kapott reakcióelegyet leszűrjük és az oldhatatlan anyagot kis mennyiségű vízzel mossuk. A szűrletet és a mosófolyadékot egyesítjük. 257,0 ml vizes nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin-oldatot kapunk. A vizes oldat 150 mg/ml N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint tartalmaz (tisztasága 79%).

A nagynyomású folyadékkromatogram, amelyet az (A) feltételek mellett vettünk fel, az 1. ábrán látható.

(B) N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin tisztítása

800 ml, előzetesen vízzel duzzasztott sztirol-divinilbenzol kopolimer gyantát (pórustérfogata 1,077 ml/g, fajlagos felülete $718,0 \text{ m}^2/\text{g}$, szemcsemérete $280-370 \mu$, gyártja Mitsubishi Chemical Industries Ltd., márkaneve Diaion HP-20) oszlopba (átmérője 5,25 cm, magassága 37,0 cm) töltünk. Az (A) szerint kapott 170 ml vizes oldatot (a nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin vizes oldatát) a N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillinnek a gyantán való adszorbeálása céljából átvezetünk az oszlopon. Az oszlopon azután 2,0 térbességgel ($26,7 \text{ ml}/\text{perc}$ áramlási sebességgel) vizet engedünk át és 900 ml-enként frakciókat gyűjtünk. Minden frakció esetén 272 nm-en végzett ultraibolya abszorpciós vizsgálattal meghatározzuk a frakcióban levő anyagot. Az (A) és (B) szennyeződés az 1. illetve a 2. frakcióban van, míg az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint a 3-17. frakciók tartalmazzák. A fenti műveletek során a (C) és (D) szennyeződés nem eluálódik. A 3-17. frakciókat egyesítjük és így 13 500 ml vizes N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin-oldatot kapunk. A kapott vizes oldat $1,78 \text{ g/ml}$ N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint tartalmaz. Kitermelés: 94,1%.

Nagynyomású folyadékkromatográfia [(A) feltételek mellett vizsgáljuk]: a vizes oldatban szennyeződés nem mutatható ki.

A kapott vizes oldat liofilizálásával fehér por alakjában kapjuk az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint.

$\text{IR}_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ (cm^{-1}): 3280, 1760, 1660

Vékonyréteggromatográfia (szilikagél, oldószer n-butanol/ecetsav/víz 4 : 1 : 1 arányú elegye):

$R_f = 0,43$.

2. példa

800 ml előzetesen vízben duzzasztott sztirol-divinilbenzol kopolimer gyantát (pórustérfogata $1,077 \text{ ml/g}$, fajlagos felülete $718,0 \text{ m}^2/\text{g}$, szemcsemérete $280-370 \mu$, gyártja Mitsubishi Chemical Industries Ltd., márkaneve Diaion HP-20) oszlopba (átmérője 5,25 cm, magassága 37,0 cm) töltünk. 167 ml 1-(A) példa szerint előállított vizes oldatot (a nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin vizes oldatát) az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillinnek a gyantán való adszorbeálása céljából átvezetünk az oszlopon. Az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillinnek a gyantán való adszorbeálódása után az oszlopon egymás után vizet (1800 ml) és 8 térf./térf.%-os vizes etanolt vezetünk át 2,0 térbességgel és 900 ml-enként frakciókat gyűjtünk. A fenti művelet során az (A) és (B) szennyeződés az 1. illetve a 2. frakcióba, míg az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin a 3-6. frakciókba eluálódik. A (C) és (D) szennyeződés ennek a műveletnek a során nem eluálódik le a gyantáról. A 3-6. frakciókat egyesítjük és így 3600 ml vizes nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin-oldatot kapunk. Ez az oldat $6,68 \text{ mg/ml}$ N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint tartalmaz. Kitermelés: 96%.

Nagynyomású folyadékkromatográfia [(A) feltételek mellett vizsgáljuk]: a vizes oldatban szennyeződés nem mutatható ki.

3. példa

800 ml, előzetesen vízben duzzasztott sztirol-divinilbenzol kopolimer gyantát (pórustérfogata $0,687 \text{ ml/g}$, fajlagos felülete $704,7 \text{ m}^2/\text{g}$, szemcsemérete $280-370 \mu$, gyártja Mitsubishi Chemical Industries Ltd., márkaneve Diaion HP-40) oszlopba (átmérője 5,25 cm, magassága 37,0 cm) töltünk. 167 ml 1-(A) példa szerint kapott vizes oldatot (a nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin vizes oldatát) az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillinnek a gyantán való adszorbeálása céljából átvezetünk az oszlopon. Az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillinnek a gyantán való adszorbeálódása után egymás után vizet (1600 ml) és 2 térf./térf.%-os vizes etanolt vezetünk át az oszlopon 2,0 térbességgel és 1000 ml-enként frakciókat gyűjtünk. A fenti művelet során az (A) és (B) szennyeződés az 1., illetve a 2. frakcióba, az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin pedig a 3-8. frakciókba eluálódik. A (C) és (D) szennyeződések a fenti művelet során nem eluálódik le a gyantáról. A 3-8. frakciókat egyesítjük és így 6000 ml vizes nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin-oldatot kapunk. A vizes oldat $4,03 \text{ mg/ml}$ N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint tartalmaz.

Kitermelés: 96,5%.

Nagynyomású folyadékkromatográfia [(A) feltételek mellett vizsgáljuk]: a vizes oldatban szennyeződés nem mutatható ki.

4. példa

7693 ml, előzetesen vízben duzzasztott sztirol-divinilbenzol kopolimer gyantát (pórustérfogata 1,077 ml/g, fajlagos felülete 718 m²/g, szemcsemérete 280–370 μ, gyártja Mitsubishi Chemical Industries Ltd., márkaneve Diaion HP–20) oszlopba (átmérője 14,0 cm, magassága 50,0 cm) töltünk. 1667 ml 1–(A) példa szerint előállított vizes oldatot (a nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin vizes oldatát) az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillinnek a gyantán való adszorbeálása céljából átvezetünk az oszlopon. Ezután egymás után vizet (1600 ml) és 4 térf./térf.%-os vizes etanolt vezetünk át az oszlopon 2,0 térbességgel és 7000 ml-enként frakciókat gyűjtünk. A fenti művelet során az (A) és (B) szennyeződés az 1. illetve a 2. frakcióba, az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin pedig a 3–11. frakciókba eluálódik. Ezzel a művelettel a (C) és (D) szennyeződés nem eluálódik le a gyantáról. A 3–11. frakciókat egyesítjük és így 6300 ml vizes nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin-oldatot kapunk. Az oldat 3,85 mg/ml N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint tartalmaz.

Kitermelés: 97,0%.

Nagynyomású folyadékkromatográfia [(A) feltételek mellett vizsgáljuk]: a vizes oldatban szennyeződés nem mutatható ki.

5. példa

800 ml, előzetesen vízben duzzasztott sztirol-divinilbenzol kopolimer gyantát (pórustérfogata 0,693 ml/g, fajlagos felülete 300 m²/g, szemcsemérete 280–840 μ, gyártja Rohm and Haas, márkaneve Amberlite XAD–2) oszlopba (átmérője 5,25 cm, magassága 37,0 cm) töltünk. 200 ml 1–(A) példa szerint előállított vizes oldatot (a nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin vizes oldatát) az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillinnek a gyantán való adszorbeálása céljából átvezetünk az oszlopon. Az oszlopon ezután egymás után vizet (2000 ml) és 2 térf./térf.%-os vizes etanolt vezetünk át 4,0 térbességgel és 1000 ml-enként frakciókat gyűjtünk. A fenti művelet során az (A) és (B) szennyeződés az 1. illetve a 2. frakcióba, az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin pedig a 3–10. frakciókba eluálódik. A (C) és (D) szennyeződés nem eluálódik le a gyantáról. A 3–10. frakciókat egyesítjük és így 8000 ml vizes nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin-oldatot kapunk. Az oldat 3,60 mg/ml N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint tartalmaz.

Kitermelés: 96,0%.

Nagynyomású folyadékkromatográfia [(A) feltételek mellett vizsgáljuk]: a vizes oldatban szennyeződés nem mutatható ki.

6. példa

(A) N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin szintézise

5

(1) 1,51 g N-(D-2-benziloxikarbonilamino-3-N-metil-karbamoil-propioniloxi)-szukcinimidet és 1,86 g 6-(D-2-amino-2-p-hidroxifenil-acetamido)-penicillánsav-trietilamin-sót feloldunk 10 ml dime-til-formamidban. Az oldatot 16 órán át keverjük 0–5 °C hőmérsékleten. Az így kapott reakcióelegyhez hozzáadunk 20 ml 5%-os vizes citromsav-oldatot és a reakcióelegyet 40 ml tetrahidrofuran és 20 ml etil-acetát elegyével extraháljuk. Az extraktumot vízzel mossuk, szárítjuk és az oldószer eltávolítása céljából 40 °C alatti hőmérsékleten bepároljuk. A visszamaradó anyaghoz (szintelen karamell) étert adunk és a csapadékot szűrővel összegyűjtjük. 2,35 g 6-[D-(D-2-benziloxi-karbonil-amino-3-N-metil-karbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat kapunk, szintelen tűk formájában.

Kitermelés: 91,9%

IR_{max}^{Nujol} (cm⁻¹): 3280, 1770, 1720, 1640

Vékonyréteggromatográfia (szilikagélén, oldószer tetrahidrofuran/metanol/ecetsav 50 : 50 : 3 arányú elegye): R_f = 0,663

(2) 62,7 g 6-[D-(D-2-benziloxi-karbonil-amino-3-N-metil-karbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat és 40,0 g 30%-os palládium-báriumkarbonátot 1000 ml metanolban szuszpendálunk. A szuszpenziót szobahőmérsékleten atmoszférikus nyomáson 1 órán át hidrogéngáz-légkörben rázzuk. A hidrogénfelvétel befejeződése után az oldhatatlan anyagot szűrővel eltávolítjuk. A szűrletet az oldószer eltávolítása céljából 40 °C alatti hőmérsékleten bepároljuk. A visszamaradó anyagot feloldjuk 250 ml vízben és a vizes oldatot 9 g aktív szénnel kezeljük. 250 ml vizes nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin-oldatot kapunk. A vizes oldat 150 mg/ml N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillint (tisztasága 79%) tartalmaz.

Nagynyomású folyadékkromatográfia: [(A) feltételek mellett vizsgálva] 2. ábra, [(B) feltételek mellett vizsgálva] 3. ábra.

(B) N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin tisztítása

800 ml, előzetesen vízben duzzasztott sztirol-divinilbenzol kopolimer gyantát (pórustérfogata 1,077 ml/g, fajlagos felülete 718 m²/g, szemcsemérete 280–370 μ, gyártja Mitsubishi Chemical Industries Ltd., márkaneve Diaion HP–20) oszlopba (átmérője 5,25 cm, magassága 37,0 cm) töltünk. 170 ml (A) szerint kapott vizes oldatot (a nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin vizes oldatát) az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillinnek a gyantán való adszorbeálása céljából átvezetünk az oszlopon. Az oszlopon ezután egymás után vizet (1600 ml) és 2 térf./térf.%-os vizes etanolt vezetünk át 2,0 térbességgel és 1000 ml-enként frakciókat gyűjtünk. A fenti művelettel a (B) és (E) szennyeződés az 1. illetve a 2. frakcióba, az N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin pedig a 3–8. frakciókba eluálódik. A (C) és

(D) szennyeződés nem eluálódik le a gyantáról a művelet során. A 3–8. frakciókat egyesítjük és így 6000 ml vizes nyers N'-metil-D-aszparaginil-amoxicillin-oldatot kapunk. A vizes oldat 4,12 mg/ml N'-metil-D-aszparaginil- amoxicillint tartalmaz.

Kitermelés: 97%.

Nagynyomású folyadékkromatográfia [(A) és (B) feltételek mellett vizsgáljuk]: a vizes oldatban szennyeződés nem mutatható ki.

Szabadalmi igénypontok:

1. Eljárás nyers 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metil-karbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsav tisztítására, azzal jellemezve, hogy

(A) a 6-[D-2-(D-2-amino-3-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsav vizes oldatát nem-poláros, makroporózus sztirol-divinilbenzol kopolimer adszorpciós gyantával hozzuk érintkezésbe és így a 6-[D-2-(D-2-amino-3-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat adszorbeáljuk a gyantán, majd

(B) az adszorbeált 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat vízzel vagy víznek és valamilyen vízzel elegyedő szerves oldószernek az elegyével eluáljuk, majd

(C) a tiszta 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat izoláljuk az eluátumból.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, azzal jellemezve, hogy gyantaként 0,6–1,1 ml/g pórustérfogatú, 200–800 m²/g fajlagos felületű és 45–840 µ szemcseméretű sztirol-divinilbenzol kopolimert alkalmazunk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, azzal jellemezve, hogy a vízből és valamilyen vízzel elegyedő szerves oldószerből álló elegyként víznek és valamilyen 1–3 szénatomos alkanolnak az elegyét alkalmazzuk.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, azzal jellemezve, hogy a vízből és valamilyen vízzel elegyedő szerves oldószerből álló elegyként 2–8 térf./térf.%-os vizes metanolt vagy 2–8 térf./térf.%-os vizes etanolt alkalmazunk.

5. A 2–4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás foganatosítási módja, azzal jellemezve, hogy 0,5–25 súly/térf.%-os vizes 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsav-oldatot és a vizes oldatban jelenlevő 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsav 1 g-jára számítva 3–100 ml térfogatú gyantát alkalmazunk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, azzal jellemezve, hogy az eluálási lépésben a 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsav vizes oldatát 0,1–5 térbességgel a nem-poláros, makroporózus gyantával töltött oszlopon vezetjük át és így a 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat a gyantán adszorbeáljuk, majd az oszlopon 0,3–15

térsebességgel vizet vagy víznek és valamilyen szerves oldószernek az elegyét vezetjük át és így az adszorbeált 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat eluáljuk az oszlopról.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, azzal jellemezve, hogy az eluálási lépésben a vizet 0,5–5 térsebességgel vezetjük át az oszlopon.

8. A 6. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, azzal jellemezve, hogy a vízből és valamilyen vízzel elegyedő szerves oldószerből álló elegyet 1–3 térsebességgel vezetjük át az oszlopon.

9. Eljárás az (1) képletű penicillsavat, 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsav és az (1) képletű penicillsav (2) képletű kondenzációs termékét, színes anyagokat és D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetsavat (vagy amoxicillint) tartalmazó 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsav vizes oldatának tisztítására, azzal jellemezve, hogy

(A) a vizes oldatot nem-poláros, makroporózus sztirol-divinilbenzol kopolimer adszorpciós gyantát tartalmazó oszlopon vezetjük át és így a 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat adszorbeáljuk a gyantán, majd

(B) az oszlopon vizet vagy víznek és valamilyen vízzel elegyedő szerves oldószernek az elegyét vezetjük át és így az adszorbeált 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat eluáljuk az oszlopról, majd

(C) a tiszta 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat izoláljuk az eluátumból.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, azzal jellemezve, hogy

(A) a vizes oldatot 0,1–5 térsebességgel vezetjük át az oszlopon és így a 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat, (1) képletű penicillsavat, a penicillánsavnak és penicillsavnak (2) képletű kondenzációs termékét, a színes anyagokat és a D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetsavat (vagy amoxicillint) adszorbeáljuk a gyantán, majd

(B)-(a) az oszlopon 0,3–15 térsebességgel vizet vezetünk át és így az adszorbeált 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat eluáljuk az oszlopról, vagy

(b)-(i) az oszlopot vízzel mossuk és így a D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetsavat (vagy amoxicillint) és a penicillsavat eltávolítjuk az oszlopról, és

(ii) az oszlopon 0,3–5 térsebességgel víznek és valamilyen vízzel elegyedő szerves oldószernek az elegyét vezetjük át és így az adszorbeált 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat eluáljuk az oszlopról, majd

(C) a tiszta 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsavat izoláljuk az eluátumból.

11. A 9. vagy 10. igénypont szerinti eljárás fogantatási módja, azzal jellemezve, hogy gyantaként 0,6–1,1 ml/g pórustérfogatú, 200–800 m²/g fajlagos felületű és 45–840 μ szemcseméretű sztirol-divinil-benzol kopolimert alkalmazunk.

12. A 10. igénypont szerinti eljárás fogantatási módja, azzal jellemezve, hogy 0,5–25 súly/térf.%-os vizes 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsav-oldatot és a vizes oldatban jelenlevő 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsav 1 g-jára számítva 3–100 ml térfogatú gyantát alkalmazunk.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás fogantatási módja, azzal jellemezve, hogy a vízből és valamilyen vízzel elegyedő szerves oldószerből álló elegyként

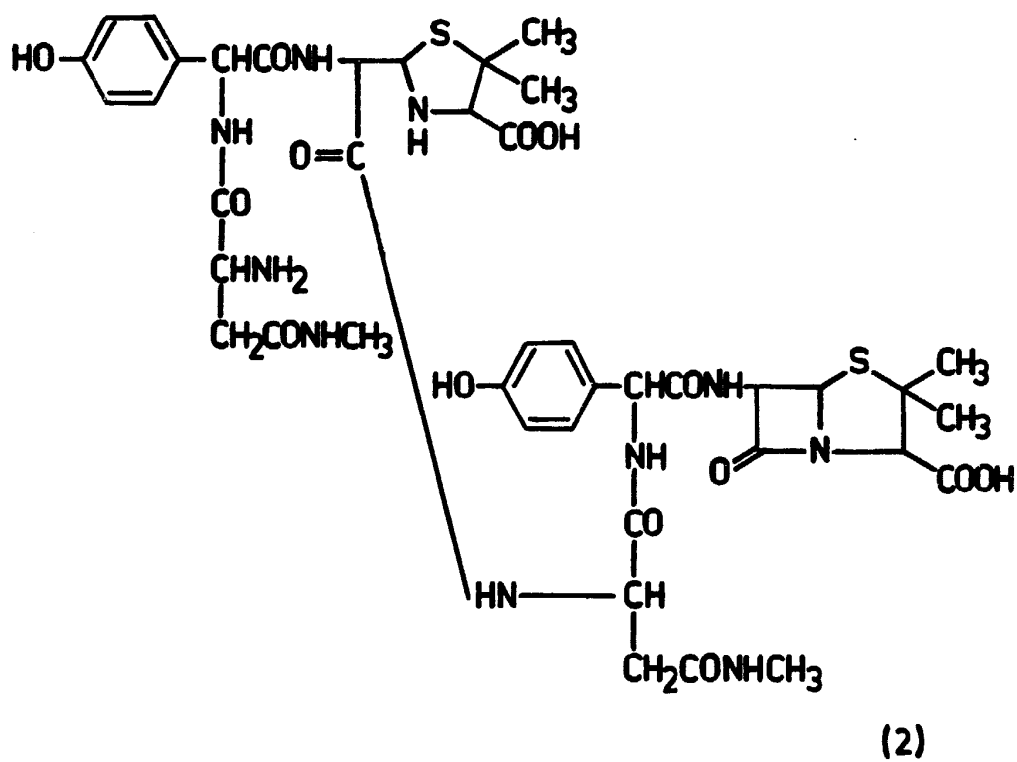
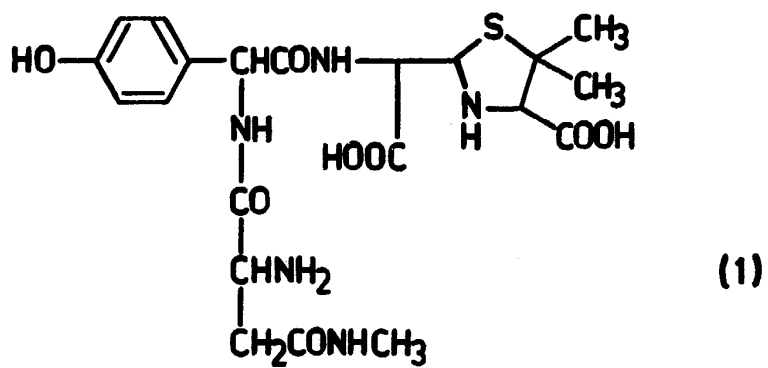
víznek és valamilyen 1–3 szénatomos alkanolnak az elegyét alkalmazzuk.

14. A 12. igénypont szerinti eljárás fogantatási módja, azzal jellemezve, hogy a vízből és valamilyen vízzel elegyedő szerves oldószerből álló elegyként 2–8 térf./térf.%-os vizes metanolt vagy 2–8 térf./térf.%-os vizes etanolt alkalmazunk.

15. A 12. igénypont szerinti eljárás fogantatási módja, azzal jellemezve, hogy a 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsav eluálása a víznek az oszlopon 0,5–5 térsébséggel történő átvezetésével végezzük.

16. A 14. igénypont szerinti eljárás fogantatási módja, azzal jellemezve, hogy a 6-[D-2-(D-2-amino-3-N-metilkarbamoil-propionamido)-2-p-hidroxifenil-acetamido]-penicillánsav eluálását a vizes metanolnak vagy vizes etanolnak az oszlopon 1–3 térsébséggel történő átvezetésével végezzük.

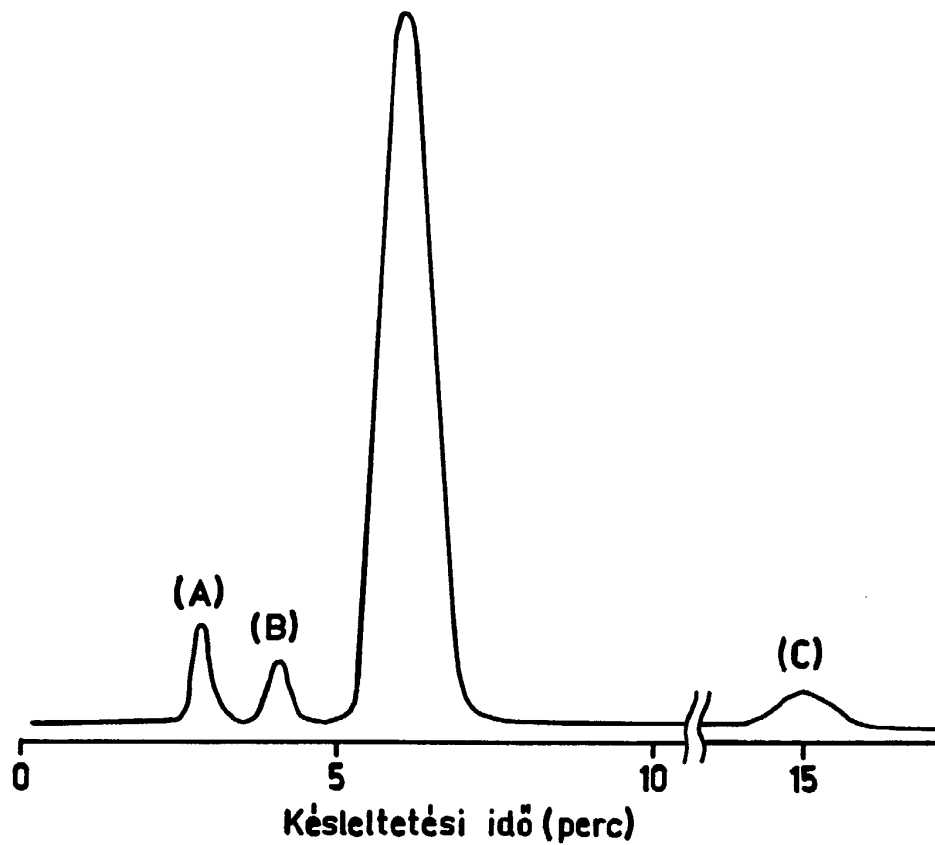
3 rajz



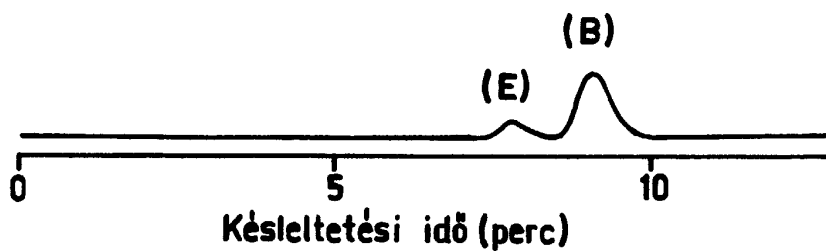
3/2

1. ábra

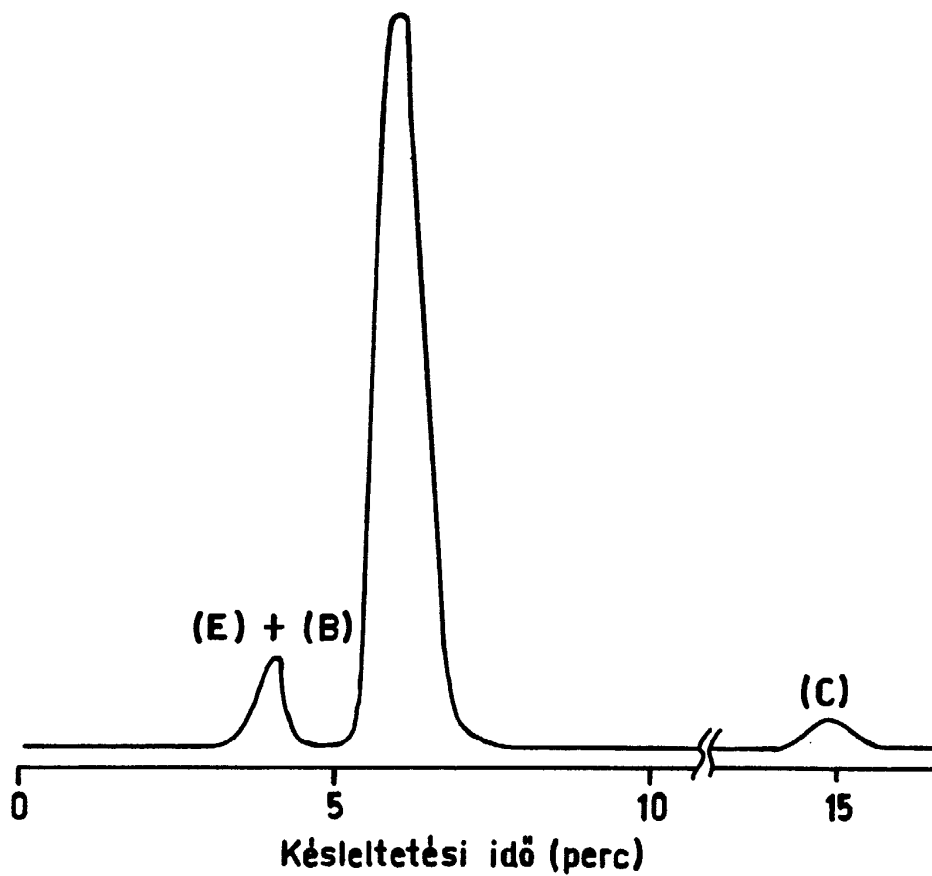
(N'-metil-D-asparaginil-amoxicillin)



3. ábra



(N'-metil-D-asparaginil-amoxicillin)



2. ábra