

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 143657 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

- (21) Ansøgning nr. 4940/72 (51) Int.Cl.³ C 12 Q 1/34
(22) Indleveringsdag 6. okt. 1972 // C 12 Q 1/04
(24) Løbedag 6. okt. 1972
(41) Alm. tilgængelig 8. apr. 1973
(44) Fremlagt 21. sep. 1981
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 7. okt. 1971, 46798/71, GB

(71) Ansøger GLAXO LABORATORIES LIMITED, Greenford, GB.

(72) Opfinder Cynthia Hilda O'Callaghan, GB: John Colin Clark, GB:
James Kennedy, GB: Susan Mary Kirby, GB: m.fl.

(74) Fuldmægtig Kontor for Industriel Eneret v. Svend Schønning.

- (54) Fremgangsmåde og testreagens til
afprøvning af biologiske prøver
for beta-laktamaseaktivitet.

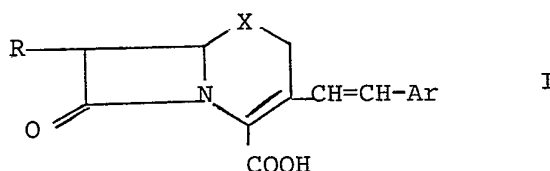
Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til afprøvning af biologiske prøver for β -laktamaseaktivitet, især en bakteriekultur i et flydende medium eller i agar, ved hvilken fremgangsmåde prøven bringes i kontakt med en cephalosporinforbindelse på en sådan måde at der fremkommer en farveindikation for tilstedeværelse af den ringåbnede laktam.

De cephalosporinforbindelser der omtales i nærværende beskrivelse har generelt fået navn ud fra stoffet cepham (se J. Amer. Chem. Soc., 1962, 84, 3400).

Det er kendt at β -laktamringen i cephalosporinforbindelser kan åbnes enten biokemisk ved hjælp af β -laktamaser (der fx frembringes af visse stammer af cephalosporin-resistente bak-

terier), eller kemisk, fx ved hjælp af baser eller syrer. Der er nu fundet en gruppe cephalosporinforbindelser som ved åbning af β -laktamringen giver farvede produkter. Disse forbindelser kan derfor anvendes som farveindikatorer der viser tilstedeværelse af β -laktamase.

I overensstemmelse hermed er fremgangsmåden ifølge opfindelsen ejendommelig ved at man i nærværelse af vand bringer den biologiske prøve i kontakt med en cephalosporinforbindelse med den almene formel



hvor R er en amino- eller formamidogruppe eller en gruppe med formelen $R'CH_2CONH-$, $R'OCH_2CONH-$, $R'CONH-$, $R'\underset{\substack{| \\ X'}}{CH}CONH-$ eller

$R'\underset{\substack{|| \\ NOR^2}}{C}CONH-$ hvor R' er en arylgruppe, X' en amino- eller beskyttet

aminogruppe og R^2 hydrogen eller en alkylgruppe, og hvor Ar er en fenyl-, naftyl-, tienyl-, pyridyl- eller furylgruppe som bærer mindst én nitro- eller cyangruppe i konjugation med den exocykliske $-CH=CH-$ dobbeltbinding, og X betegner $-S-$, $-SO-$ (α eller β) eller $-SO_2-$; eller et salt eller en vandopløselig ester deraf.

Salte af forbindelser med den almene formel I af særlig interesse er ifølge opfindelsen alkalimetalsalte (fx med natrium eller kalium) og ammoniumsalte, da de har god opløselighed.

Ifølge opfindelsen kan R i forbindelsen I være en 2-hydroxyimino-2-fenylacetamido-, naftamido-, formamido-, fenylacetamido-, 2-amino-2-fenylacetamido-, tienylacetamido- eller fenoxycetamidogruppe.

Når Ar i forbindelsen I er en fenylgruppe som bærer en eller flere nitro- eller cyangrupper, kan ifølge opfindelsen disse hensigtsmæssigt være i orto- og/eller parastilling for at sikre maksimal konjugering med $-CH=CH-$ dobbeltbindingen.

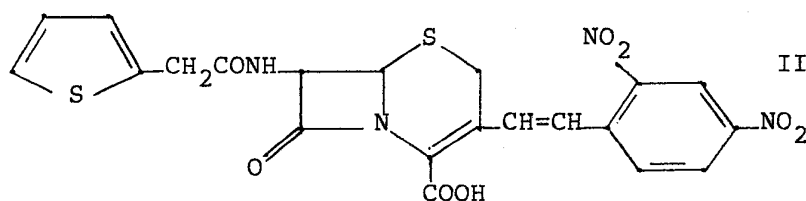
Som det nærmere forklares nedenfor kan Ar i forbindel-

sen I med fordel være en 4-cyanofenyl-, 2-nitrofenyl- eller 4-nitrofenylgruppe, hvorved der opnås gode farvereaktioner.

Nitro- og cyangruppernes funktion er at være elektron-tilbagetrækkende, og ifølge opfindelsen kan gruppen Ar i forbindelsen I med fordel bære mindst to nitro- og/eller cyan-grupper, således at den samlede elektrontilbagetrækkende effekt bliver stor.

Særlig kraftig og karakteristisk rød farvereaktion får man hvis ifølge opfindelsen Ar er en 2,4-dinitrofenyl- eller 2,6-dinitrofenylgruppe. En meget stabil forbindelse med god og kraftig farvereaktion opnås således ifølge opfindelsen, hvis R i forbindelsen I er en fenoxycetamidogruppe og Ar en 2,4-dinitrofenylgruppe.

Foretrukne forbindelser er altså sådanne hvor Ar er 4-nitrofenyl, 2-nitrofenyl, 2,4-dinitrofenyl eller 2,6-dinitrofenyl. Alle disse forbindelser giver en orange eller rød farve når β -laktamringen åbnes. 2,4-Dinitrofenylforbindelserne giver en særlig stærk og karakteristisk rød farve. Forbindelser af ganske særlig interesse er ifølge opfindelsen (6R,7R)-3-(E-2,4-dinitrostyryl)-7-fenoxycetamidoceph-3-em-4-karboxylsyre og (6R,7R)-3-(E-2,4-dinitrostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylsyre, hvoraf sidstnævnte har formlen



samt salte deraf.

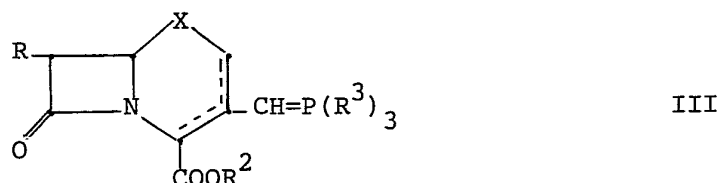
Forbindelser hvor Ar er en 4-cyanofenylgruppe kan anvendes hvis man af en eller anden grund foretrækker en grøn farvereaktion.

Forbindelser med den almene formel I ligger inden for grænserne af den almindelige klasse forbindelser der er vist i belgisk patentskrift nr. 761.897, men de eneste forbindelser der er specifikt vist deri og hvor Ar er en aromatisk gruppe som indeholder mindst én elektron-tilbagetrækkende

gruppe, er sådanne hvor gruppen Ar er en 4-nitrofenylgruppe.

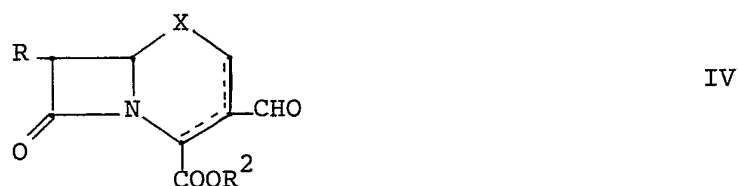
De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendte forbindelser kan fremstilles ved de almene metoder der er vist i nævnte belgiske patentskrift, fx ved at man

a) omsætter en forbindelse med den almene formel



hvor R og X har de foran angivne betydninger, R² er et hydrogenatom eller en karboxylblokerende gruppe og R³ er en organisk substitueret gruppe, med en aldehydforbindelse med den almene formel ArCHO, hvor Ar har den foran angivne betydning, eller

b) omsætter en forbindelse med den almene formel



hvor R, X og R² har de under (a) angivne betydninger, med et fosforan-ylid med den almene formel



hvor R³ og Ar har de under (a) angivne betydninger, hvorefter man om ønsket eller nødvendigt (c) foretager en hvilken som helst af følgende reaktioner:

- (i) omdannelse af en Δ^2 -isomer til den ønskede Δ^3 -isomer,
- (ii) reducerer en forbindelse hvor X er en gruppe -SO- til en forbindelse hvor X betegner -S-,
- (iii) oxyderer en forbindelse hvor X er -S- til en forbindelse hvor X er -SO- eller -SO₂-, eller oxyderer en forbindelse hvor X er -SO- til en forbindelse hvor X er -SO₂-,
- (iv) omdanner en blokeret aminogruppe R til en fri aminogruppe,

- (v) omsætter en forbindelse hvor R er en fri aminogruppe med et reagens der tjener til at omdanne denne aminogruppe til en blokeret aminogruppe, fx med et acylerende derivat af en karboxylsyre,
- (vi) foretager isomerisation (cis $\leftrightarrow$ trans) af den exocykliske -CH=CH- dobbeltbinding,
- (vii) fjerner en karboxylblokerende gruppe fra 4-karboxylgruppen og/eller fjerner en hvilken som helst gruppe som beskytter en hvilken som helst amino- eller karboxylgruppe der måtte være til stede i en blokeret aminogruppe R, og/eller
- (viii) danner et salt eller en vandopløselig ester af 4-karboxylforbindelsen.

I afhængighed af mønsteret og arten af substitution i gruppen Ar i formel I kan enten cis- eller trans-isomeren være fordelagtig i henseende til at give en noget dybere og mere intens farve end den anden isomer, eller eventuelt på grund af forbedret vandopløselighed. I almindelighed foretrækkes imidlertid ifølge opfindelsen trans-isomerer. Isomeriseringen kan udføres ved passende kemisk behandling, fx med trifluoreddikesyre og anisol eller ved bestråling.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til afprøvning af en biologisk prøve er af særlig interesse for β -laktamase-aktivitet i bakteriekulturer. Det er kendt at modstandsevne mod nogle bakteriestammer mod den antibakterielle virkning af cephalosporin- og penicillinforbindelser skyldes de β -laktamase-enzymmer, som dannes af bakterierne, idet enzymerne virker til at nedbryde og inaktivere cephalosporinerne og penicillinerne ved normale doseringer. Hidtil har identifikationen af sådanne bakteriestammer været en ret vanskelig sag som i almindelighed kræver dyrkning af en kultur, inkubering med en β -laktamforbindelse og til slut tilsætning af et yderligere reagens som giver en farveindikation af tilstedeværelse af den ringåbnede laktam.

I modsætning hertil giver den foreliggende fremgangsmåde en hurtig og positiv indikation af β -laktamase-aktiviteten. Alt hvad der behøves er at bringe en bakteriekultur i kontakt med en forbindelse med den almene formel I eller et salt eller en vandopløselig ester deraf; i tilfælde af

en kultur indeholdende en høj koncentration af en aktiv β -laktamase vil der næsten øjeblikkeligt blive iagttaget en farve. Hvis der ikke fremkommer nogen farve efter 30 minutters inkubering ved 37°C med testforbindelsen, kan man slutte at β -laktamaseaktiviteten er meget lav eller ikke findes.

Den eller de elektrontilbagetrækkende substituerter i gruppen Ar, dvs. nitro- og/eller cyangrupperne, gør β -laktamringen særlig labil, og man kan derfor slutte at en bakteriestamme, som ikke giver positiv indikation af β -laktamaseaktivitet med testforbindelsen, efter al sandsynlighed ikke vil frembringe ringåbning hos nogen kemoterapeutisk betydningsfuld cephalosporin- eller penicillinforbindelse.

Produktionen af farve er et værdifuldt træk ved opfindelsen, eftersom β -laktamaseaktivitet kan bedømmes kvalitativt uden at man behøver at gribe til spektrofotometere eller andre optiske instrumenter.

Tilførslen af en forbindelse med den almene formel I til prøven kan udføres på forskellige måder. I tilfælde af bakteriekulturer kan man sætte en eller flere dråber testopløsning (idet opløsningsmidlet normalt er vand, om ønsket i blanding med en mindre mængde af et organisk opløsningsmiddel som fx dimetylformamid eller dimetylsulfoxyd) til en prøve eller til gæringsvæsken, eller en eller flere sådanne dråber kan dryppes på en agarplade.

Testen kan gøres kvantitativ ved standardisering af koncentrationerne og rumfangene af prøver og af testreagenser samt af inkuberingsperioden, idet farveintensiteten måles enten ved hjælp af et spektrofotometer eller ved en eller anden slags optisk sammenligningsinstrument.

Den farve der udvikles på agarplade er ustabil og begynder at svinde eller falme på ca. 3 timer ved 37°C . Farver der fremkaldes i gæringskulturer er normalt stabile i mindst 24 timer. Det anbefales at forsøget aflæses efter 30 minutter og før 3 timer, regnet fra det tidspunkt hvor reagenset tilsættes.

Det skal bemærkes at forbindelser med den almene formel I har antibakteriel virkning, og et forsøg på at dyrke

en organisme i nærværelse af testforbindelsen vil derfor ikke altid resultere i en tilfredsstillende prøve på β -laktamase-aktiviteten, navnlig i tilfælde af grampositive bakterier. I almindelighed vil man derfor dyrke bakterien og derefter behandle kulturen med testforbindelsen. Denne behandlingsmåde er særligt at foretrække i tilfælde af agar-kulturer.

Meget ofte behøves der kun en kvalitativ indikation af β -laktamaseaktivitet, og til dette formål er det hensigtsmæssigt at anvende testforbindelsen imprægneret i et absorberende materiale af en hvilken som helst hensigtsmæssig størrelse og form, bestående af fx absorberende cellulosemateriale såsom papir. Hensigtsmæssigt kan absorptionsmaterialet have form af en skive af tykt papir som kan anbringes på en agar-kultur, hvorved man undgår at håndtere en opløsning af testreagenset. Til anvendelse på bakteriekulturer eller bakterienæringsvæsker eller andre flydende prøver er det absorberende materiale eller absorptionsorganet hensigtsmæssigt i langstrakt form, så at man kan dyppe det i vedkommende væskeformede prøve. Tilvejebringelsen af testreagenser der er imprægneret i skiver, strimler eller stænger, er velkendt i og for sig. Imprægneringen vil i almindelighed blive udført med en vandig opløsning af testforbindelsen eller fortrinsvis et salt deraf. Hvis vandopløseligheden er utilstrækkelig kan der bruges et organisk opløsningsmiddel, fx dimetylformamid, enten alene eller i vandig opløsning. Koncentrationen af den imprægneringsopløsning der behøves til at frembringe en tilfredsstillende farveændring med et hvilket som helst givet reagens kan let bestemmes ved simple forsøg. Koncentrationer af størrelsesordenen 1 mg/ml er sædvanligvis tilfredsstillende. Til slut vil opløsningsmidlet blive afdampet ved forsigtig opvarmning, eventuelt under nedsat tryk.

De absorberende materialer bør være hvide eller lyse så at den farve der frembringes ved testen ikke gøres uklar. Det er ønskeligt at undgå overdreven eksponering til lys før anvendelsen ved passende indpakning.

Opfindelsen angår også et testreagens til anvendelse ved afprøvning for β -laktamase-aktivitet ved den beskrevne fremgangsmåde, og ifølge opfindelsen består det af et hvidt

eller lyst absorbentmateriale, hensigtsmæssigt papir, imprægneret med en forbindelse med den almene formel I eller et vandopløseligt salt eller en vandopløselig ester deraf. Ifølge opfindelsen er forbindelsen med formel I særlig hensigtsmæssigt i form af et vandopløseligt salt.

Ved en anden form af et testreagens ifølge opfindelsen til anvendelse ved den foran beskrevne fremgangsmåde består det af en opløsning af en forbindelse med den almene formel I eller et salt eller en ester deraf i en koncentration på 10-2000 µg/ml, ifølge opfindelsen fortrinsvis 50-250 µg/ml. Ifølge opfindelsen er forbindelsen eller dens salt eller ester fortrinsvis opløst i vand eller vand indeholdende en mindre mængde, fx 0,1-10 rumfangs%, af et organisk opløsningsmiddel; dette er ifølge opfindelsen særlig hensigtsmæssigt dimetylformamid eller dimetylsulfoxyd.

Den foreliggende opfindelse er af interesse i relation til patologi, hvor det ofte er ønskeligt at finde ud af om en bakteriestamme har evne til at danne β -laktamase. Denne oplysning påvirker valget af det antibiotikum der skal anvendes til bekæmpelse af den specielle stamme, og desuden kan en sådan oplysning være relevant for den nøjagtige identifikation af stammen. Mange forskellige bakterier, både grampositive og gramnegative, som vides at danne β -laktamaser, har vist sig at reagere positivt på testmetoden ifølge opfindelsen. Eksempler herpå er *Enterobacter cloacae* P 99, *Escherichia coli* TEM, *Klebsiella aerogenes* Kl, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Bacillus licheniformis*. Grampositive organismer har tendens til at være følsomme for den antibakterielle virkning af testforbindelserne og bør altid dyrkes før de afprøves ved den foreliggende prøve-metode.

En anden betydningsfuld anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ved mikrobiologiske undersøgelser, navnlig over de transmitterbare R-faktorer som formidler β -laktamase-produktion. R-faktorer er ekstrakromosomale genetiske elementer som er ansvarlige for overførelse af antibiotisk resistens fra resistente bakterier til oprindeligt følsomme stammer. Eksistensen af denne overføringsmekanisme

volder for tiden store bekymringer i relation til den udstrakte anvendelse af antibiotika mod forholdsvis små eller lidet betydningsfulde sygdomme samt i foderstoffer til dyr. Hvis overføringen af resistens indbefatter evnen til udviklingen af β -laktamase, tilvejebringer den foreliggende opfindelse en simpel metode til angivelse af hvorvidt R-faktoren er til stede eller ej.

En anden mulig anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen er påvisning af β -laktamaser i urinen fra patienter med infektioner i urinvejene og bevirket af β -laktamasedannende organismer.

Foruden at være en følsom prøve på β -laktamaser, giver forbindelserne med den almene formel I eller deres salte også positiv indikation med visse andre organiske materialer såsom æggehvide og serumalbumin. Dette bør holdes i erindring når man afprøver for β -laktamaseaktivitet. Den positive reaktion menes at skyldes tiolgrupperne i disse materialer. Der fremkommer også en positiv testreaktion af glutation og merkaptoætanol. Desuden giver tioglycolsyre en svagt positiv reaktion. Blandt tyve afprøvede aminosyrer gav kun cystein en positiv reaktion. Forbindelser indeholdende tiometyl på disulfidgrupper gav ikke positiv reaktion.

Som resultat af denne følsomhed hos testforbindelserne over for materialer såsom serumalbumin kan det være fordelagtigt ved afprøvning for β -laktamaseaktivitet først at afprøve en blindprøve, dvs. et medium som ikke indeholder β -laktamase, for at skaffe sig klarhed over at der ikke er noget sådant indgribende materiale til stede, som har sandsynlighed for at give falske resultater.

Når man bruges testreagenset ifølge opfindelsen foretrækkes det at anvende en pH-værdi i nærheden af neutralpunktet fx i området 5,5-8,5. Ekstreme pH-værdier nedbryder reagenset, og i tilfælde af prøve på β -laktamaseaktivitet inaktiverer de også enzymet.

Opfindelsen skal i det følgende belyses nærmere ved hjælp af nogle eksempler, dels nummererede på fremstilling af forbindelserne, dels litererede på fremstilling og anvendelse af testreagenset.

De følgende generelle betingelser gælder for alle eksemplerne med mindre andet er udtrykkeligt angivet.

Petroleumsæter var af fraktionen med kogepunkt $40-60^{\circ}\text{C}$. Protonmagnetiske resonansspektre (PMR) målt ved 100 MHz. Signaler for koblingskonstanter er ikke tilskrevet. Integrallerne stemte med de anførte strukturer.

Elektroforese udførtes på "Whatman" [®] 3MM papir ved pH 1,9 og en spændingsgradient på ca. 25 volt/cm. Mobiliteter (M) (mod katoden) er i forhold til dextranblåt.

Søjlekromatografi udførtes på "Merck" [®] kiselgel (0,05-0,2 mm).

Tyndlagskromatografi udførtes opadstigende på "Merck" [®] GF₂₅₄₊₃₆₆ silikaplayer, og følgende opløsningsmidler anvendtes til fremkaldelse:

System A Øvre fase af n-butanol/ætanol/vand = 4:1:5, ækvilibreret ved stuetemperatur.

System D Benzen/ætylacetat = 5:1.

System E Benzen/ætylacetat = 2:1.

System F Kloroform/petroleumsæter/acetone = 20:5:1.

Papirkromatografi udførtes i følgende systemer:

System B "Whatman" [®] nr. 1 papir pufret til pH 6, fremkaldt nedad ved ca. 25°C med topfase af n-butanol/ætanol/vand = 4:1:5, i ligevægt med bundfasen.

System C "Whatman" [®] nr. 1 papir pufret til pH 5, fremkaldt nedad ved 37°C med en øvre fase af n-butanol/ætylacetat/0,1 M natriumacetat = 1:8:8, i ligevægt med den nedre fase.

System B Er n-butanol/ætanol/vand = 4:1:5, ækvilibreret ved stuetemperatur, idet den øvre fase bruges som fremkalder i nedadgående bevægelse, i ligevægt med den nedre fase, på "Whatman" [®] nr. 3MM papir pufret til pH 6 med 0,05M natriumdihydrogenfosfat.

System C er ætylacetat/n-butanol/0,1M natriumacetat pH 5 = 8:1:8, ækvilibreret ved 38°C , idet den øvre fase bruges som fremkalder på nedadgående måde, i ligevægt med den nedre fase ved 38°C , på nr. 1 "Whatman" [®] papir pufret til pH 5 med 0,1M natriumacetat.

Følgende forkortelser bruges for pletternes udseende:

s = stærk, m = medium, f = svag.

PMR- og IR-spektre (I = infrarødt) stemte med de tilskrevne strukturer.

De cephalosporinderivater der anvendtes som udgangsmaterialer i eksemplerne 1 (a) og 1 (b) fremstilledes som beskrevet i forannævnte belgiske patentskrift nr. 761.897.

Eksempel 1

(A) Difenylmetyl-(6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-(2-tienyl-acetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat, Z-isomer (med E-isomer)

(a) En opløsning af 9,8 g (50 mmol) 2,4-dinitrobenzaldehyd i 500 ml tørt metylenklorid omrørtes ved ca. 23°C og portionsvis tilsattes der i løbet af 45 minutter 7,65 g (10 mmol) difenylmetyl-(6R,7R)-3-(trifenylfosforanylidenmetyl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat. Efter omrøring i yderligere 40 minutter, klaredes opløsningen ved filtrering gennem kiselgur, hvorefter den koncentreredes til ca. 50 ml og rensedes ved kromatografering på 300 g kiselgel med kloroform som elueringsmiddel.

Inddampning af eluatet gav 15,326 g af en olie, som opløstes i 15 ml benzen, og denne opløsning rensedes yderligere ved kromatografering på 300 g kiselgel med benzen/ætylacetat 10:1 som elueringsmiddel.

Fraktioner med R_f ca. 0,5 (System D) forenedes og inddampedes i vakuum og det tilbageværende skum (4,226 g, 61,5%) tritureredes med 25 ml æter, hvorved der fremkom 3,493 g (51,2%) af den i overskriften angivne ester som gule flager med smp. 88-108°C (sønderdeling). $[\alpha]_D^{20} = -443^\circ$ ($c = 0,9$ i CHCl_3), λ_{max} (ætanol) 287 nm ($\epsilon = 11300$), og 375 nm ($\epsilon = 11800$), inflektion ved 235 nm ($\epsilon = 24700$); PMR (CDCl_3) viste at dette materiale var en blanding (i forholdet ca. 85:15) af Z- og E-isomerer.

(b) En opløsning af 29,4 g (0,15 mol) 2,4-dinitrobenzaldehyd i 250 ml metylenklorid omrørtes kraftigt med 750 ml mættet natriumbikarbonat/vand 1:1, og der tilsattes dråbevis i

løbet af 30 minutter en opløsning af 42,2 g (0,05 mol) (6R,7R)-[4-difenylmetoxykarbonyl-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-3-ylmetyl]-trifenylfosfoniumbromid i 250 ml metylenklorid.

Efter omrøring i yderligere 30 minutter fraskiltes den organiske fase, koncentreredes til ca. 100 ml og rensedes ved kromatografering på 1,4 kg kiselgel med ca. 5 liter metylenklorid efterfulgt af ca. 13 liter kloroform som eluenter. Inddampning af kloroformeluatet gav 40,8 g af et skum som opløstes i 40 ml benzen, og denne opløsning rensedes yderligere ved kromatografering på 600 g kiselgel med benzen/ætylacetat 10:1 som elueringsmiddel.

Fraktioner med R_f ca. 0,5 (system D) forenedes og indampedes i vakuum, og det tilbageværende skum (19,7 g, 58%) tritureredes med 100 ml æter, hvorefter suspensionen filtreredes og gav den i overskriften angivne ester som orange farvede flager i en mængde på 15,765 g (46,3%), smp. 104-116°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{20} = -409^\circ$ ($c = 1,12$ i CHCl_3), λ_{max} (ætanol) 287 nm ($\epsilon = 10450$) og 375 nm ($\epsilon = 17000$), inflektion ved 235 nm ($\epsilon = 24000$); PMR (CDCl_3) viste at denne prøve var en blanding (mængdeforholdet ca. 4:1) af Z- og E-isomerer.

Filtratet inddampedes i vakuum, remanensen opløstes i ætylacetat og opløsningen overførtes til petroleumsæter til et næste udbytte af den i overskriften angivne ester som et amorft orange farvet fast stof i en mængde på 1,344 g (4%), smp. 86-91°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{20} = -416^\circ$ ($c = 1,1$ i CHCl_3), λ_{max} (ætanol) 280 nm ($\epsilon = 11300$), og 363 nm ($\epsilon = 10600$), inflektion ved 235 nm ($\epsilon = 23900$); PMR i CDCl_3 viste at dette materiale i hovedsagen var Z-isomeren.

De infrarøde spektre og kromatografiske karakteristiker af begge disse prøver lignede dem der er beskrevet under (a) foran.

(B) 3-(2,4-Dinitrostyryl)-(6R,7R)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylsyre, E-isomer

En opløsning af 11,0 g (16,1 mmol) difenylmetyl-(6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat (Z-isomeren med ca. 20% E-isomer) i en blanding

af en 44 ml eddikesyre og 11 ml anisol holdtes på 23°C i 7 minutter, hvorefter opløsningsmidlerne fjernedes ved 40°C/2 mm Hg.

Der tilsattes 10 ml ætylacetat, opløsningen inddampedes i vakuum og remanensen tritureredes med 75 ml æter, hvorved der fremkom 7.359 (88,6%) af den i overskriften angivne syre som et orange farvet fast stof med smp. 103-113°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{20} = -224^\circ$ (c = 1,0 i dioxan), $\lambda_{\max}$ (ætanol) 231 nm ($\epsilon = 24300$), 289 nm ($\epsilon = 10300$), og 386 nm ($\epsilon = 18000$), $\lambda_{\max}$ (0,1M-pH 6 fosfatpuffer) 233 nm ($\epsilon = 22200$), 290 nm ($\epsilon = 12200$), og 391 nm ($\epsilon = 17400$), PMR i DMSO- d_6 indbefatter τ 2,37 og 2,72 (CH=CH, to dubletter, J 16 Hz), 4,73 ($C_{(6)}-H$, dublet, J 5 Hz), og 5,94 og 6,26 ($C_{(6)}-H$, AB-kvartet, J_{AB} 18 Hz). R_f 0,42 (system B), og 0,82 (system C).

Eksempel 2

(A) Difenylmetyl-(2'R,6R,7R)-3-iodometyl-7-(2'-t-butoxykarbonylamino-2'-fenylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat

En opløsning af 43,7 g difenylmetyl-(2'R,6R,7R)-3-klormetyl-7-(2'-t-butoxykarbonylamino-2'-fenylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat i 250 ml acetone behandledes med en opløsning af 45 g natriumjodid i 250 ml acetone. Blandingen omrøres i mørket i 2 timer og udhældtes derefter i 2 liter tynd saltlage, hvorefter det hele ekstraheredes med 2 x 500 ml ætylacetat. Ekstrakterne vaskedes med vand og vandig 1% natriumtiosulfatopløsning og derefter med yderligere mængder vand, hvorpå der tørredes og inddampedes til ca. 150 ml i vakuum.

Denne opløsning overførtes til 2,5 liter kraftigt omrørt petroleumsater, hvorved der vandtes jodmetylforbindelsen som et amorft flødefarvet fast stof i en mængde på 44,4 g (89%), smp. 110-127°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -53,5^\circ$ (c = 1,0 i $CHCl_3$), $\lambda_{\max}$ (ætanol) 282 nm ($\epsilon = 7850$).

(B) Difenylmetyl-(2'R,6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-(2'-t-butoxykarbonylamino-2'-fenylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat, Z-isomer (med E-isomer).

En opløsning af 2,958 g (4 mmol) difenylmetyl-

(2'R,6R,7R)-3-iodometyl-7-(2'-t-butoxykarbonylamino-2'-fenylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat i 50 ml tørt metylenklorid omrørtes i mørket ved 23°C, og en opløsning af 1,574 g (6 mmol) trifenylfosfin i 25 ml metylenklorid tilsattes dråbevis i løbet af 5 minutter. Opløsningen omrørtes i yderligere 1 time og sættes derefter dråbevis i løbet af 15 minutter til en kraftigt omrørt blanding af 2,353 g (12 mmol) 2,4-dinitrobenzaldehyd i 50 ml metylenklorid og 50 ml mættet natriumbi-karbonat/vand 1:1. Efter omrøring i yderligere 40 minutter fraskiltes den organiske fase, vaskedes med 50 ml saltlage, koncentreredes til ca. 25 ml og rensedes ved kromatografering på 100 g kiselgel med ca. 1 liter metylenklorid efterfulgt af ca. 1 liter kloroform som elueringsmidler.

Inddampning af kloroformeluatet gav 3,43 g af et skum som opløstes i 10 ml benzen, og denne opløsning rensedes yderligere ved kromatografering på 80 g kiselgel med benzen/ætylacetat 10:1 som elueringsmiddel. Fraktioner med R_f ca. 0,5 (system D) forenedes og inddampedes i vakuum og det tilbageværende skum (1,74 g, 55%) opløstes i ætylacetat, hvorefter opløsningen overførtes til petroleumsæter og gav den i overskriften angivne ester som et amorft gult fast stof i en mængde på 1,489 g (47%), smp. 112-119°C (sønderdeling($[\alpha]_D^{23} = -316^\circ$ ($c = 1,08$ i CHCl_3), λ_{max} (ætanol) 282 nm ($\epsilon = 11200$), og 368 nm ($\epsilon = 12100$), PMR i CDCl_3 viste at dette materiale var en blanding (ca. 85:15) af Z- og E-isomerer. R_f 0,51 (system D), og 0,35 (system F).

(C) (2'R,6R,7R)-7-(2'-amino-2'-fenylacetamido)-3-(2,4-dinitrostyryl)-ceph-3-em-4-karboxylsyrens trifluoreddikesyre-salt, E-isomer

En opløsning af 1,30 g (1,64 mmol) af Z-isomerer (med ca. 15% E-isomer) af difenylmetyl-(2'R,6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-(2'-t-butoxykarbonylamino-2'-fenylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat i en blanding af 10 ml trifluoreddikesyre og 2,5 ml anisol holdtes på 25°C i 5 minutter, hvorefter opløsningsmidlerne fjernedes ved 40°C (2 mm Hg).

Der tilsattes 20 ml ætylacetat og opløsningen indampedes i vakuum, hvorefter remanensen behandledes med 20 ml

æter til frembringelse af 988 mg (95%) af trifluoreddikesyre-saltet som et gult fast stof med smp. 156-163°C (sønderdeling), λ_{max} (ætanol) 280 nm ($\epsilon = 10000$), og 387 nm ($\epsilon = 13100$); PMR i DMSO- d_6 indbefatter τ 2,33 og 2,82 (CH=CH, to dubletter, J 16 Hz), 4,80 ($C_{(6)}$ -H, dublet, J 5 Hz), og 6,07 og 6,37 ($C_{(2)}$ -H, AB-kvartet, J_{AB} 18 Hz).

Eksempel 3

(A) Difenylmetyl-(6R,7R)-3-(4-nitrostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat, Z- og E-isomer

(a) En opløsning af 1,2 g (16 mmol) 4-nitrobenzaldehyd i 100 ml metylenklorid omrørtes i mørke ved 23°C med 100 ml mættet natriumbikarbonat/vand 1:1 og portionsvis tilsattes i løbet af 20 minutter 1,786 g (2 mmol) (6R,7R)-[4-difenylmetoxy-karbonyl-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-ylmetyl]-trifenylfosfoniumjodid.

Efter omrøring i yderligere 40 minutter fraskiltes det organiske lag, det vaskedes med 100 ml saltlage og tørredes og koncentreredes til ca. 20 ml, hvorefter det rensedes ved kromatografering på 120 g kiselgel med 1 liter metylenklorid efterfulgt af 1 liter kloroform som elueringsmidler. Inddampning af kloroformeluatet gav 1,46 g af et skum som opløstes i 10 ml benzen, og denne opløsning rensedes yderligere ved kromatografering på 30 g kiselgel med benzen/ætylacetat 10:1 som elueringsmiddel.

Fraktioner med R_f ca. 0,5 (system D) forenedes og inddampedes i vakuum til et olieagtigt fast stof i en mængde på 900 mg (70,6%). Dette faste stof behandledes med 50 ml metanol og gav E-isomeren som 175 mg (13,7%) gule nåle med smp. 239-242°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -177^\circ$ ($c = 0,94$, $CHCl_3$), λ_{max} (ætanol) 368 nm ($\epsilon = 27300$), inflektioner ved 295 nm ($\epsilon = 8300$), og 235 nm ($\epsilon = 20300$), R_f 0,52 (system D), 0,70 (system E), og 0,60 (system F).

Moderluden inddampedes i vakuum og remanensen opløstes i ætylacetat, hvorefter opløsningen overførtes til petroleumsæter og gav Z-isomeren som 480 mg (37,6%) af et lysegult amorft fast stof med smp. 85-91°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} =$

-435° ($c = 0,81$ i CHCl_3), λ_{max} (ætanol) 344 nm ($\epsilon = 13500$), og 283 nm ($\epsilon = 10800$), inflektion ved 235 nm ($\epsilon = 18600$).
 R_f 0,52 (system D), 0,70 (system E), og 0,60 (system F).

(b) En opløsning af 3,0 g (20 mmol) af 4-nitrobenzaldehyd i 100 ml tørt metylenklorid omrørtes ved 23°C og der tilsattes portionsvis i løbet af 1 time 3,83 g (5 mmol) difenylmetyl-(6R,7R)-3-trifenylfosforanylidenmetyl-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat. Efter omrøring i yderligere 1 time koncentreredes opløsningen til ca. 25 ml og rensedes ved kromatografering på 100 g kiselgel med kloroform som elueringsmiddel.

Eluatet inddampedes i vakuum, remanensen opløstes i 100 ml ætylacetat, opløsningen vaskedes med 2 x 100 ml mættet natriumbikarbonat, 2 x 100 ml vand og 100 ml saltlage og tørredes, hvorefter det inddampedes til 7,91 g af et olieagtigt fast stof. Det faste stof opløstes i 80 ml benzen og opløsningen rensedes yderligere ved kromatografering på 160 g kiselgel med benzen/ætylacetat 10:1 som elueringsmiddel.

Forening af fraktionerne med R_f ca. 0,5 (system D) gav 2,05 g (64%) af et skum som opløstes i ætylacetat, og opløsningen overførtes til petroleumsæter og gav den i overskriften angivne ester som et gult amorft fast stof i en mængde på 1,64 g (51,5%) med smp. $90-95^{\circ}\text{C}$ (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -425^{\circ}$ ($c = 0,69$ i CHCl_3), λ_{max} (ætanol) 361 nm ($\epsilon = 18700$), inflektioner ved 283 nm ($\epsilon = 18900$), og 235 nm ($\epsilon = 18700$); PMR i CDCl_3 viste at dette materiale var en blanding (mængdeforholdet ca. 3:1) af Z- og E-isomeren med signaler ved τ 3,40 (CH=CH), og 6,68 og 7,01 ($\text{C}_{(2)}\text{-H}$) for Z-isomeren, og ved τ 2,48 og 3,35 (CH=CH), og 6,29 og 6,50 ($\text{C}_{(2)}\text{-H}$) for E-isomeren.

(B) 3-(4-Nitrostyryl)-(6R,7R)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylsyre, E-isomer

303 mg (0,475 mmol) af E-isomeren af difenylmetyl-(6R,7R)-3-(4-nitrostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat behandledes med 1,2 ml trifluoreddikesyre og 0,3 ml anisol, og efter 5 minutter inddampedes reagenserne ved

40°C/2 mm Hg. Remanensen opløstes i 100 ml ætylacetat, opløsningen ekstraheredes med 300 ml og 2 x 50 ml vandig natriumkarbonatopløsning, hvorefter ekstrakten dækkedes med 200 ml ætylacetat og syrnedes til pH 2 med 2N saltsyre. Den organiske fase fraskiltes, vaskedes med 50 ml vand og 50 ml saltlage, tørredes og indampedes til 145 mg (65%) af et fast stof.

Triturering af dette faste stof med 20 ml æter gav syren som gule plader i en mængde på 95 mg (42%) og smp. 173-191°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -42^\circ$ (c = 0,75 acetone), $\lambda_{\max}$ (0,1M-pH 6 fosfatpuffer) 233 nm ($\epsilon = 16200$) og 375 nm ($\epsilon = 21600$), inflektion ved 300 nm ($\epsilon = 10100$); $\lambda_{\max}$ (ætanol) 232 nm ($\epsilon = 16100$) og 372,5 nm ($\epsilon = 22600$), inflektion ved 291 nm ($\epsilon = 8200$); PMR i DMSO- d_6 indbefatter τ 2,32 og 2,84 (CH=CH), to dubletter, J 16 Hz), 4,76 (C₍₆₎-H, dublet J 5 Hz), og 5,88 og 6,26 (C₍₂₎-H, AB-kvartet, J_{AB} 18 Hz). R_f 0,55 (system B), og 0,81 (system C).

(C) (6R,7R)-3-(4-Nitrostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylsyre, Z-isomer (med E-isomer)

En opløsning af 1,27 g (1,99 mmol) af Z-isomeren af difenylmetyl-(6R,7R)-3-(4-nitrostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat i en blanding af 5 ml trifluoreddikesyre og 1,3 ml anisol holdtes på ca. 23°C i 5 minutter, hvorefter opløsningsmidlerne fjernedes ved 40°C/2 mm Hg og remanensen fordeltes mellem 100 ml ætylacetat og 100 ml mættet natriumbikarbonat/vand 1:1. Den vandige fase fraskiltes, syrnedes til pH 2 med 2N saltsyre, ekstraheredes med 150 ml ætylacetat, hvorefter ekstrakten vaskedes med 100 ml vand og 100 ml saltlage, tørredes og indampedes i vakuum. Det tilbageværende skum, 875 mg (93%) opløstes i ætylacetat og opløsningen overførtes til petroleumsæter, hvorved syren vandtes som et lysegult amorft fast stof i en mængde på 715 mg (76%) med smp. 95-110°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -307^\circ$ (c = 1,15 i dioxan), $\lambda_{\max}$ (ætanol) 232,5 nm ($\epsilon = 16700$), 288 nm ($\epsilon = 11100$), og 371 nm ($\epsilon = 17600$), $\lambda_{\max}$ (0,1M-pH 6 fosfatpuffer) 231,5 nm ($\epsilon = 18300$), 284,5 nm ($\epsilon = 13100$), og 355 nm ($\epsilon = 12400$); PMR i DMSO- d_6 viste at dette materiale var en

blanding (mængdeforhold 1:1) af Z- og E-isomerer, med signaler ved τ 3,26 (CH=CH, singlet), 4,76 (C₍₆₎-H, dublet, J 5 Hz), og 6,37 og 6,80 (C₍₂₎-H, AB-kvartet, J_{AB} 18 Hz) for Z-isomeren, og ved 2,32 og 2,84 (CH=CH), og 5,88 og 6,26 (C₍₂₎-H) for E-isomeren. R_f 0,55 (system B), og 0,81 (system C).

Eksempel 4

(A) Difenylmetyl-(2'R,6R,7R)-3-(4-nitrostyryl)-7-(2'-t-butoxykarbonylamino-2'-fenylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat, Z-isomeren (med E-isomer)

En opløsning af 1,479 g (2 mmol) difenylmetyl-(2'R,6R,7R)-3-iodmetyl-7-(2'-t-butoxykarbonylamino-2'-fenylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat i 20 ml tørt metylenklorid omrørtes i mørke ved 23°C og der tilsattes dråbevis i løbet af 5 minutter en opløsning af 787 mg (3 mmol) trifenylfosfin i 10 ml metylenklorid. Opløsningen omrørtes i yderligere 90 minutter og sattes dråbevis til en kraftigt omrørt blanding af 1,2 g (8 mmol) 4-nitrobenzaldehyd i 50 ml metylenklorid og 50 ml mættet natriumbikarbonat/vand 1:1. Efter omrøring i yderligere 40 minutter fraskiltes den organiske fase, den vaskedes med 50 ml saltlage, tørredes og indampedes til 3,33 g af et olieagtigt fast stof.

En opløsning af dette faste stof i 10 ml metylenklorid rensedes ved kromatografering på 100 g kiselgel med ca. 1 liter metylenklorid efterfulgt af ca. 1,5 liter kloroform som elueringsmidler. Inddampning af kloroformeluatet gav 1,65 g af et skum som opløstes i 10 ml benzen og denne opløsning rensedes yderligere ved kromatografering på 32 g kiselgel med benzen/ætylacetat 10:1 som elueringsmiddel.

Forening af fraktioner med R_f ca. 0,5 (system D) gav 669 mg (45%) af et skum som opløstes i ætylacetat, og opløsningen overførtes til petroleumsæter, hvorved der vandtes esteren som 570 mg (38%) af et lysegult amorft fast stof med smp. 111-118°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -329^\circ$ (c = 0,92 i CHCl₃), $\lambda_{\max}$ (ætanol) 285 nm ($\epsilon = 9000$), og 359 nm ($\epsilon = 18600$); PMR i CDCl₃ viste at dette produkt var en blanding (ca. 7:3) af Z- og E-isomererne. R_f 0,52 (system D) og 0,40 (system F).

(B) 3-(4-Nitrostyryl)-(2'R,6R,7R)-7-(2'-amino-2'-fenylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylsyre, trifluoreddikesyresalt (E-isomer)

En opløsning af 500 mg (0,67 mmol) difenylmetyl-(2'R,6R,7R)-3-(4-nitrostyryl)-7-(2'-t-butoxykarbonylamino-2'-fenylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat (forhold Z/E 7:3) i en blanding af 4 ml trifluoreddikesyre og 1 ml anisol holdtes på 23°C i 5 minutter, hvorefter opløsningsmidlerne fjernedes ved 40°C (2 mm Hg) og remanensen tritureredes med 20 ml æter; herved fremkom trifluoreddikesyresaltet som et gult fast stof i en mængde på 350 mg (88%), smp. 153-156°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -212^\circ$ (c = 0,9 i dioxan), $\lambda_{\max}$ (ætanol) 290 nm ($\epsilon = 9450$), og 372,5 nm ($\epsilon = 18400$); PMR i DMSO- d_6 indbefatter τ 2,48 og 2,90 (CH=CH, to dubletter, J 16 Hz), 4,83 (C₍₆₎-H, dublet, J 5 Hz), og 6,02 og 6,40 (C₍₂₎-H, AB-kvartet, J_{AB} 18 Hz).

Eksempel 5

(A) Difenylmetyl-(6R,7R)-3-(4-cyanostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat, Z- og E-isomer

En opløsning af 6,56 g (50 mmol) 4-cyanobenzaldehyd i 250 ml tørt metylenklorid omrørtes ved 23°C, og der tilsattes i løbet af 2 timer portionsvis 3,825 g (5 mmol) difenylmetyl-(6R,7R)-3-(trifenylfosforanylidenmetyl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat. Opløsningen omrørtes i yderligere 16 timer, koncentreredes til ca. 25 ml og rensedes ved kromatografering på 120 g kiselgel med ca. 2 liter metylenklorid efterfulgt af ca. 2 liter kloroform som elueringsmidler.

Inddampning af kloroformeluatet gav 4,15 g af et skum som opløstes i 20 ml benzen, og denne opløsning rensedes yderligere ved kromatografering på 90 g kiselgel med benzen/ætylacetat 10:1 som elueringsmiddel. Fraktioner med R_f ca. 0,45 (system D) forenedes og inddampedes i vakuum til 2,016 g (65%) af et lysegult fast stof. Dette faste stof behandledes med 50 ml varm metanol, suspensionen afkøledes til ca. 23°C og de faste stoffer frafiltreredes og tørredes i vakuum til frembringelse af E-isomeren som farveløse nåle i en mængde

på 615 mg (20%), smp. 235-237°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -194^\circ$ ($c = 0,83$ i CHCl_3), λ_{max} (ætanol) 346,5 nm ($\epsilon = 33100$), inflektioner ved 257 nm ($\epsilon = 11200$) og 235 nm ($\epsilon = 19200$). R_f 0,46 (system D) og 0,58 (system F).

Moderluden inddampedes i vakuum, remanensen opløstes i ætylacetat og opløsningen overførtes til petroleumsæter, hvorved man vandt Z-isomereren som et amorf farveløst fast stof i en mængde på 1,15 g (38%), med smp. 91-97°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -47,2^\circ$ ($c = 0,91$ i CHCl_3), λ_{max} (ætanol) 326 nm ($\epsilon = 14800$), og 258 nm ($\epsilon = 12900$), inflektion ved 235 nm ($\epsilon = 19100$). R_f 0,46 (system D) og 0,58 (system F).

(B) (6R,7R)-3-(4-Cyanostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylsyre, E-isomer

En opløsning af 534 mg (0,864 mmol) af E-isomereren af difenylmetyl-(6R,7R)-3-(4-cyanostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat i 2 ml trifluoreddikesyre og 0,5 ml anisol holdtes på ca. 23°C i 5 minutter, opløsningsmidlerne afdampedes ved 40°C/2 mm Hg, der tilsattes 10 ml ætylacetat og den resulterende suspension inddampedes i vakuum.

Remanensen tritureredes med 25 ml æter hvorved der fremkom syren som gule nåle i en mængde på 368 mg (94%), smp. 118-129°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -38^\circ$ ($c = 1,05$ i acetone), λ_{max} (ætanol) 234,5 nm ($\epsilon = 16800$), og 347 nm ($\epsilon = 29300$), inflektion ved 256 nm ($\epsilon = 10100$); PMR i $\text{DMSO}-d_6$ indbefatter τ 2,38 og 2,86 (CH=CH, to dubletter, J 16 Hz), og 5,90 og 6,28 ($\text{C}_{(2)}\text{-H}$, AB-kvartet, J_{AB} 18 Hz). R_f 0,41 (system B), og 0,86 (system C).

(C) (6R,7R)-3-(4-Cyanostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylsyre, Z-isomer

En opløsning af 1,0 g (1,62 mmol) af Z-isomereren af difenylmetyl-(6R,7R)-3-(4-cyanostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat i en blanding af 4 ml trifluoreddikesyre og 1 ml anisol holdtes på ca. 23°C i 2 minutter, og opløsningsmidlerne fjernedes ved 40°C/2 mm Hg. Remanensen fordeltes mellem 50 ml ætylacetat og 50 ml mættet natriumbikarbonat/vand 1:1; den vandige fase fraskiltes, syrnedes (til

pH 2) med 2N saltsyre og ekstraheredes med 100 ml + 25 ml ætylacetat. Ekstrakten vaskedes med 50 ml vand og 50 ml saltlage, tørredes og inddampedes i vakuum.

Det tilbageværende skum i en mængde på 763 mg, opløstes i ætylacetat og opløsningen overførtes til petroleumsæter, hvorved der fremkom syren som 594 mg (81%) af et lysegult amorft fast stof med smp. 80-102°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -354^\circ$ ($c = 1,18$ i dioxan), $\lambda_{\max}$ (0,1M-pH 6 fosfatpuffer) 233 nm ($\epsilon = 18800$), og 320 nm ($\epsilon = 14100$), inflektion ved 255 nm ($\epsilon = 14000$), $\lambda_{\max}$ (ætanol) 234 nm ($\epsilon = 17900$), og 322,5 ($\epsilon = 14400$), inflektion ved 260 nm ($\epsilon = 10400$), PMR i DMSO- d_6 indbefatter τ 3,32 (CH=CH, singlet), 4,76 (C₍₆₎-H, dublet, J 5 Hz), og 6,40 og 6,82 (C₍₂₎-H, AB-kvartet, J_{AB} 18 Hz). R_F 0,41 (system B), og 0,86 (system C).

Eksempel 6

(A) Difenylmetyl-(6R,7R)-7-amino-3-(2,4-dinitrostyryl)-ceph-3-em-4-karboxylat, Z-isomer (med E-isomer)

En opløsning af 0,58 ml (7,2 mmol) pyridin i 5 ml tørt metylenklorid sættes i løbet af 5 minutter til en under omrøring værende opløsning af 1,5 g (7,2 mmol) fosforpentaklorid i 20 ml tørt metylenklorid. Efter omrøring i yderligere 5 minutter afkøledes den varme suspension og der tilsattes dråbevis i løbet af 10 minutter en opløsning af 2,5 g (3,66 mmol) af Z-isomerer (med ca. 20% E-isomer) af difenylmetyl-(6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat i 25 ml metylenklorid, idet temperaturen holdtes på ca. 0°C.

Omrøringen fortsattes i yderligere 2 timer i løbet af hvilken periode man lod temperaturen stige til ca. 23°C, hvorefter opløsningen udhældtes i en afkølet (ca. 10°C) blanding af 15 ml metanol og 20 ml metylenklorid; den resulterende opløsning omrørtes i 15 minutter, vaskedes med 50 ml N saltsyre og omrørtes i 30 minutter med 100 ml mættet natriumbikarbonat. Den organiske fase fraskiltes, vaskedes med 50 ml mættet natriumbikarbonat og 50 ml saltlage, tørredes og inddampedes i vakuum.

Den tilbageværende olie opløstes i kloroform og opløsningen overførtes til petroleumsater, hvorved aminen fremkom som et orangefarvet fast stof i en mængde på 1,332 g (65,3%), smp. 117-127°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{20} = -356^\circ$ ($c = 1,11$ i CHCl_3), λ_{max} (CHCl_3) 286,5 ($\epsilon = 10800$), og 375 nm ($\epsilon = 12000$); PMR i DMSO-d_6 viste at dette materiale var en blanding (mængdeforhold 3:1) af Z- og E-isomerer. R_f 0,43 (system E), M 5,2 cm.

(B) Difenyl-(6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-(1-naftoylamino)-ceph-3-em-4-karboxylat, Z-isomer (med E-isomer)

En opløsning af 1,117 g (2 mmol) af Z-isomereren (med ca. 25% E-isomer) af difenylmetyl-(6R,7R)-7-amino-3-(2,4-dinitrostyryl)-ceph-3-em-4-karboxylat i 20 ml tørt N,N-dimetylformamid omrørtes ved 23°C og behandledes i løbet af 10 minutter med en opløsning af 420 mg (2,2 mmol) 1-naftoyl-klorid i 10 ml tørt acetonitril. Efter omrøring i yderligere 1 time fjernedes opløsningsmidlerne ved 40°C/2 mm Hg, reanensen opløstes i 100 ml ætylacetat, opløsningen vaskedes med 2 x 50 ml mættet natriumbikarbonat, 50 ml vand og 50 ml saltlage, tørredes og indampedes til et skum (1,565 g). Dette materiale opløstes i 10 ml benzen og opløsningen rensedes ved kromatografering på 32 g kiselgel med benzen/ætylacetat 10:1 som elueringsmiddel. Fraktionerne R_f ca. 0,6 og 0,5 (system D) forenedes og indampedes i vakuum, det tilbageværende faste stof, der androg 900 mg (63%) tritureredes med 25 ml æter og gav esteren som orangefarvede prismer i en mængde på 7,25 mg (51%), smp. 124-148°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -331^\circ$ ($c = 1,12$, CHCl_3) λ_{max} (ætanol) 281,5 nm ($\epsilon = 16600$), og 373 nm ($\epsilon = 15000$); PMR i CDCl_3 viste at dette materiale var en blanding (ca. 7:3) af Z- og E-isomererne. R_f 0,58 og 0,51 (henholdsvis Z- og E-isomererne (system D), og R_f 0,51 (system F).

(C) (6R,7R)-3-(2,4-Dinitrostyryl)-7-(1-naftoylamino)-ceph-3-em-4-karboxylsyre, E-isomer

En opløsning af 600 mg (0,84 mmol) af Z-isomereren (med ca. 25% E-isomer) af difenylmetyl-(6R,7R)-3-(2,4-dinitrosty-

ryl)-7-(1-naftoylamino)-ceph-3-em-4-karboxylat i en blanding af 2,4 ml trifluoreddikesyre og 0,6 ml anisol holdtes på 23°C i 5 minutter og opløsningsmidlerne fjernedes ved 40°C/2 mm Hg. Der tilsattes 20 ml ætylacetat, den resulterende opløsning inddampedes i vakuum og remanensen tritureredes med 20 ml æter, hvorved der fremkom syren som et mørk orange-farvet fast stof i en mængde på 325 mg (70,5%), smp. 136-145°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -312^\circ$ ($c = 0,49$ i acetone), $\lambda_{\max}$ (ætanol) 282 nm ($\epsilon = 15700$), og 390 nm ($\epsilon = 14200$); PMR i DMSO- d_6 indbefatter 2,72 (CH=CH, dublet, J 16 Hz), 4,58 (C₍₆₎-H, dublet, J 5 Hz), og 5,91 og 6,21 (C₍₂₎-H; AB-kvartet, J_{AB} 18 Hz). R_F 0,55 (system B), og 0,78 (system C).

Eksempel 7

(A) Difenylmetyl-(6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-[(Z)-2-hydroxyimino-2-fenylacetamido]-ceph-3-em-4-karboxylat, Z-isomeren (med E-isomer)

En opløsning af 1,117 g (2 mmol) af Z-isomeren (ca. 25% E-isomer) af difenylmetyl-(6R,7R)-7-amino-3-(2,4-dinitrostyryl)-ceph-3-em-4-karboxylat, fremstillet som i eksempel 6 (A), og 0,57 ml propylenoxyd i 10 ml tørt ætylacetat omrøres ved 23°C og behandles i løbet af 10 minutter med en M-opløsning af (Z)-2-dikloracetoxymimino-fenylacetylchlorid i ætylacetat (2 x 4 ml, ca. 1,2 ækvivalent). Efter omrøring i yderligere 45 minutter vaskedes opløsningen med 20 ml 2N saltsyre og 20 ml mættet natriumbikarbonat, tørredes og inddampedes til 1,892 g af et skum. Dette materiale opløstes i 5 ml benzen og opløsningen rensedes ved kromatografering på 60 g kiselgel med benzen/ætylacetat 10:1 som elueringsmiddel. Fraktioner med R_F ca. 0,4 (system D) forenedes og inddampedes i vakuum, hvorefter det tilbageværende skum (999 mg, 70,7%) opløstes i ætylacetat og opløsningen overførtes til petroleumsæter; herved fremkom esteren som et amorft orange-farvet fast stof i en mængde på 886 mg (67%) med smp. 114-122°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{20} = -343^\circ$ ($c = 0,96$, CHCl₃), $\lambda_{\max}$ (ætanol) 372 nm ($\epsilon = 13200$), inflektion ved 240 nm ($\epsilon = 23600$); PMR i CDCl₃ viste at dette materiale var en blanding (mængde-

forhold ca. 4:1) af Z- og E-isomerer. R_f 0,36 (system D), og 0,12 (system F).

(B) (6R,7R)-3-(2,4-Dinitrostyryl)-7-[(Z)-2-hydroxyimino-2-fenylacetamido]-ceph-3-em-4-karboxylsyre, E-isomer

715 mg (1,01 mmol) af den under (A) beskrevne ester i 2,88 ml trifluoreddikesyre og 0,72 ml anisol holdtes på 23°C i 4 minutter og opløsningsmidlerne fjernedes ved 40°C/2 mm Hg. Remanensen opløstes i 20 ml ætylacetat, opløsningen vaskedes med 15 ml 2N saltsyre, 15 ml vand og 20 ml saltlage, tørredes og inddampedes i vakuum. Triturering af remanensen med 50 ml æter gav syren som et mørkt orangefarvet fast stof i en mængde på 242 mg (44,5%) med smp. 165-173°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{20} = -236,5^\circ$ (c = 0,9 i dioxan), λ_{max} (ætanol) 244 nm ($\epsilon = 24700$), og 389 nm ($\epsilon = 14100$); PMR i DMSO- d_6 indbefatter τ 2,72 (CH=CH, dublet, J 16 Hz), 4,64 ($C_{(6)}$ -H, dublet, J 5 Hz), og 5,96 6,25 ($C_{(2)}$ -H, AB-kvartet, J_{AB} 18 Hz). R_f 0,54 (system B), og 0,78 (system C). Denne prøve indeholdt en ringe mængde af en sur urenhed, der løb som en rød plet, R_f ca. 0,10 (system C).

Eksempel 8

(A) Difenylmetyl-(1S,6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat-1-oxyd, Z-isomer (med E-isomer)

En opløsning af 610 mg (ca. 3 mmol) meta-klorperbenzoesyre i 25 ml tørt metylenklorid sættes i løbet af 5 minutter til en under omrøring værende opløsning af 1,365 g (2 mmol) af Z-isomereren (med ca. 15% E-isomer) af difenylmetyl-(6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat, fremstillet som beskrevet i eksempel 1 (A) (b), i 25 ml metylendiklorid. Efter omrøring i yderligere 15 minutter vaskedes opløsningen med 2 x 25 ml mættet natriumbikarbonat, 2 x 25 ml vand og 25 ml saltlage og behandledes med noget trækul. Suspensionen filtreredes gennem kiselgur og filtratet tørredes og opløsningsmidlet afdampedes i vakuum. Det tilbageværende faste stof, 1,42 g, tritureredes med 25 ml æter og gav 1,25 g (89,5%) af det i overskriften angivne oxyd som

gule prismer med smp. 125-132°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{20} = -428^\circ$ ($c = 1,23$ i CHCl_3), λ_{max} (ætanol) 276 nm ($\epsilon = 11700$) og 360 nm ($\epsilon = 12700$), inflektion ved 235 nm ($\epsilon = 24000$); PMR i DMSO-d_6 viste at dette materiale var en blanding (forholdet ca. 85:15) af Z-isomerer og E-isomerer. R_f 0,44 (system E).

(B) (1S,6R,7R)-3-(2,4-Dinitrostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-
ceph-3-em-4-karboxylsyre-1-oxyd, E-isomer

En opløsning af 1,0 g (1,43 mmol) af Z-isomeren (med ca. 15% E-isomer) af difenylmetyl-(1S,6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat-1-oxyd i en blanding af 4 ml trifluoredikesyre og 1 ml anisol holdtes på 23°C i 5 minutter, og opløsningsmidlerne fjernedes ved 40°C/2 mm Hg. Der tilsattes 20 ml ætylacetat, den resulterende suspension indampedes til tørhed i vakuum og remanensen tritureredes med 25 ml æter, hvorved syren fremkom som 690 mg (90,5%) af et gult fast stof med smp. 144-150°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{22} = -300^\circ$ ($c = 0,94$ i acetone), λ_{max} (ætanol) 230 nm ($\epsilon = 24200$), 285 nm ($\epsilon = 9700$), og 376 nm ($\epsilon = 19900$); PMR i DMSO-d_6 indbefatter τ 2,22 og 2,73 ($\text{CH}=\text{CH}$, to dubletter, J 16 Hz), 4,94 ($\text{C}_{(6)}-\text{H}$, dublet, J 5 Hz), og 5,56 og 6,33 ($\text{C}_{(2)}-\text{H}_2$, AB-kvartet, J_{AB} 18 Hz). R_f 0,46 (system B) og 0,65 (system C).

Eksempel 9

(A) Difenylmetyl-(6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-formamidoceph-
3-em-4-karboxylat, Z-isomer (med E-isomer)

(a) En opløsning af 975 mg (2 mmol) difenylmetyl-(6R,7R)-3-brommetyl-7-formamidoceph-3-em-4-karboxylat og 800 mg (3 mmol) trifenylfosfin i 30 ml metylendiklorid omrørtes i mørke ved 23°C i 3 timer og sattes derefter i løbet af 10 minutter til en kraftigt omrørt opløsning af 1,177 g (6 mmol) 2,4-dinitrobenzaldehyd i en blanding af 50 ml metylendiklorid og 50 ml mættet natriumbikarbonat/vand 1:1. Efter omrøring i yderligere 30 minutter fraskiltes den organiske fase, vaskedes med 50 ml saltlage, koncentreredes til ca. 25 ml og rensedes ved kromatografering på 80 g kiselgel med ca. 1 liter metylen-

diklorid efterfulgt af ca. 1 liter metylendiklorid/acetone 1:1 som elueringsmidler. Inddampning af den sidstnævnte del af eluatet gav 1,32 g af et skum som opløstes i 5 ml benzen og denne opløsning rensedes yderligere ved kromatografering på 30 g kiselgel med benzen/ætylacetat 5:1 som elueringsmiddel. Fraktioner med R_f ca. 0,4 (system E) forenedes og indampedes til tørhed i vakuum, og det tilbageværende skum, 640 mg (54,5%) tritureredes med 20 ml æter, hvorved man vandt den i overskriften angivne ester som et orange farvet, granulært fast stof i en mængde på 485 mg (41%) med smp. 118-124°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{22} = -350^\circ$ ($c = 0,8$ i CHCl_3), λ_{max} (ætanol) 279 nm ($\epsilon = 11700$), og 365 nm ($\epsilon = 12700$) [ϵ -værdierne for $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$ (586,6), 1/2 Et_2O]; PMR i CDCl_3 viste at dette materiale var en blanding (forhold ca. 9:1) af Z- og E-isomerer. R_f 0,40 (system E).

(b) En suspension af 503 mg (1 mmol) difenylmetyl-(1S,6R,7R)-3-brommetyl-7-formamidoceph-3-em-4-karboxylat i 25 ml tørt metylendiklorid omrørtes i mørket ved 23°C, og en opløsning af 525 mg (2 mmol) trifenyldifosfin i 5 ml metylendiklorid tilsattes. Efter omrøring i 4 timer sættes opløsningen i løbet af 5 minutter til kraftigt omrørt opløsning af 589 mg (3 mmol) 2,4-dinitrobenzaldehyd i en blanding af 50 ml metylendiklorid og 50 ml mættet natriumbikarbonat/vand (forholdet 1:1). Blandingen omrørtes i yderligere 30 minutter, og den organiske fase fraskiltes, vaskedes med 50 ml saltlage, koncentreredes til ca. 50 ml og rensedes ved kromatografering på 40 g kiselgel, med metylendiklorid (ca. 1:1), efterfulgt af metylendiklorid/acetone 1:1 (ca. 500 ml) som elueringsmidler. Inddampning af den sidste del af eluatet gav 880 mg af et skum som opløstes i 5 ml metylendiklorid, og denne opløsning rensedes yderligere ved kromatografering på 35 g kiselgel med metylendiklorid/acetone 8:1 som elueringsmiddel. Fraktioner med R_f ca. 0,4 (tyndlagskromatografi på "Merck" [®] kiselgel F₂₅₄-plader, fremkaldt med metylendiklorid/acetone 4:1 forenedes og indampedes til tørhed i vakuum. Det tilbageværende faste stof, der androg 720 mg, tritureredes med 30 ml æter og gav 445 mg (74%) difenylmetyl-(1S,6R,7R)-

3-(2,4-dinitrostyryl)-7-formamidoceph-3-em-4-karboxylat-1-oxyd som et gult fast stof med smp. 115-125°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{22} = -383^\circ$ ($c = 0,82$ i CHCl_3), λ_{max} (ætanol), 264,5 nm ($\epsilon = 10400$), 271,5 nm ($\epsilon = 10200$), og 363 nm ($\epsilon = 13100$); PMR i DMSO-d_6 viste at dette materiale var en blanding (ca. 4:1) af Z- og E-isomerer.

En opløsning af 302 mg (0,5 mmol) af oxydet i 20 ml tørt metylenklorid omrørtes ved -20°C og behandledes i løbet af 5 minutter med en opløsning af 0,12 ml (ca. 2,5 ækvivalenter) fosfortribromid i 5 ml metylendiklorid. Opløsningen omrørtes i yderligere en time ved -10 til -15°C og sættes derefter i løbet af 5 minutter til 25 ml afkølet (0°C) mættet natriumbikarbonat. Blandingen omrørtes i yderligere 30 minutter, i løbet af hvilken periode man tillod temperaturen at stige til ca. 23°C, og den organiske fase fraskiltes, vaskedes med mættet natriumbikarbonat, vand og saltlage (25 ml af hver), hvorefter der behandledes med trækul, filtreredes gennem kiselgur og tørredes og indampedes til 240 mg af et fast stof. En opløsning af dette faste stof i ætylacetat overførtes til petroleumsæter og gav den i overskriften angivne ester som et gult amorft fast stof i en mængde på 200 mg (68%), smp. 90-100°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{22} = -278^\circ$ ($c = 0,95$ i CHCl_3), λ_{max} (ætanol), 285 nm ($\epsilon = 9800$), og 372 nm ($\epsilon = 14500$); PMR i CDCl_3 viste at dette materiale var en blanding (ca. 2:1) af Z- og E-isomerer. Det infrarøde spektrum og de kromatografiske karakteristika af denne prøve lignede dem der er beskrevet under (a) foran.

(B) (6R,7R)-3-(2,4-Dinitrostyryl)-7-formamidoceph-3-em-4-karboxylsyre, E-isomer

En opløsning af 1,5 g (2,56 mmol) difenylmetyl-(6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-formamidoceph-3-em-4-karboxylat, Z-isomer (med ca. 15% E-isomer) i en blanding af 6 ml trifluoreddikesyre og 1 ml anisol holdtes på 23°C i 5 minutter og opløsningsmidlerne fjernedes ved 40°C/2 mm Hg. Der tilsattes 10 ml ætylacetat, den resulterende suspension indampedes til tørhed i vakuum, remanensen opløstes i 50 ml acetone og der tilsattes ca. 1 g trækul. Blandingen omrørtes i 10 minut-

ter og filtreredes gennem kiselgur, hvorefter filtratet tørredes og inddampedes til tørhed i vakuum. Remanensen tritureredes med 50 ml æter og gav syren som orangefarvede prismer i en mængde på 854 mg (79,5%), smp. 163-169°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{24} = -95^\circ$ ($c = 1,14$ i acetone), $\lambda_{\max}$ (ætanol) 290 nm ($\epsilon = 10400$), og 384 nm ($\epsilon = 18500$), $\lambda_{\max}$ (0,1M-pH 6 fosfatpuffer) 290,5 nm ($\epsilon = 12300$), og 388 nm ($\epsilon = 18800$); PMR i DMSO- d_6 indbefatter τ 2,38 og 2,72 (CH=CH, to dubletter, J 16 Hz), 4,72 ($C_{(6)}$ -H, dublet, J 5 Hz), og 5,92 og 6,26 ($C_{(2)}$ -H₂, AB-kvartet, J_{AB} 18 Hz). R_f 0,31 (system B) og 0,36 (system C).

Eksempel 10

Difenylmetyl-(6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylat, Z-isomer (med E-isomer)

En suspension af 391 mg (0,66 mol) af Z-isomereren (med ca. 15% E-isomer) af difenylmetyl-(6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-formamidoceph-3-em-4-karboxylat i 10 ml metanol omrørtes ved 0°C og der tilsattes i løbet af 2 minutter 0,13 ml (ca. 2 ækvivalenter) fosforoxyklorid. Blandingen omrørtes i yderligere 3 timer i løbet af hvilken periode man tillod temperaturen at stige til ca. 23°C, hvorefter opløsningsmidlet fjernedes ved roterende indampning. Der tilsattes 10 ml ætylacetat og den resulterende opløsning inddampedes til tørhed i vakuum. Remanensen opløstes i metylendiklorid og opløsningen overførtes til æter, hvorved der vandtes 351 mg (88,5%) difenylmetyl-(6R,7R)-7-amino-3-(2,4-dinitrostyryl)-ceph-3-em-4-karboxylat-hydroklorid som et orangefarvet fast stof med smp. 128-136°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{22} = -279^\circ$ ($c = 0,95$ i $CHCl_3$), $\lambda_{\max}$ (ætanol) 283,5 nm ($\epsilon = 11000$), og 370 nm ($\epsilon = 14700$); PMR i DMSO- d_6 viste at dette materiale hovedsageligt var Z-isomereren.

En opløsning af 238 mg (0,4 mmol) af aminhydrokloridet i 20 ml metylendiklorid omrørtes i 20 minutter med 20 ml mættet natriumbikarbonat. Den organiske fase fraskiltes, vaskedes med 10 ml saltlage og tørredes, hvorefter der tilsattes 104 mg (0,5 mmol) dicyklohexylkarbodiimid. Den resulterende

rende opløsning omrørtes ved ca. 23°C og behandledes i løbet af 5 minutter med en opløsning af 121 mg (0,5 mmol) 2-tienyleddikesyre i 15 ml metylendiklorid. Efter omrøring i yderligere 30 minutter frafiltreredes det faste stof og filtratet omrørtes i 30 minutter med mættet natriumbikarbonat/vand 1:1 (50 ml). Den organiske fase fraskiltes, vaskedes med mættet natriumbikarbonat og saltlage (25 ml af hver) og tørredes og inddampedes i vakuum. Remanensen ekstraheredes med 20 ml ætylacetat og ekstrakten førtes gennem en kolonne af 20 g kiselgel med ætylacetat som elueringsmiddel. Eluatet inddampedes til tørhed i vakuum. Det tilbageværende faste stof, 290 mg, opløstes i ætylacetat og opløsningen overførtes til petroleumsæter; herved vandtes den i overskriften angivne ester som et lyst orangefarvet amorf fast stof i en mængde på 216 mg (82,5%) med smp. 90-96°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{22} = -350^\circ$ ($c = 0,89$ i CHCl_3) λ_{max} (ætanol) 282 nm ($\epsilon = 11400$), og 372 nm ($\epsilon = 14200$); PMR-spektret (CDCl_3) viste at dette materiale i hovedsagen var Z-isomeren.

Eksempel 11

a) Difenylmetyl-(6R,7R)-3-(2,4-dinitrostyryl)-7-fenoxyacetamido-ceph-3-em-4-karboxylat, Z-isomer (med E-isomer) (I)

En opløsning af 5,637 g (6R,7R)-(4-difenylmetoxy-karbonyl-7-fenoxyacetamidoceph-3-em-3-ylmetyl)-trifosfoniumbromid, fremstillet som beskrevet i britisk patentskrift nr. 1.342.241, i 100 ml diklormetan sættes dråbevis i løbet af 10 minutter til en kraftig omrørt blanding af 300 ml vandigt natriumbikarbonat og 300 ml diklormetan indeholdende 2,58 g 2,4-dinitrobenzaldehyd. Tofasesystemet omrørtes i yderligere 30 minutter og organiske fase fraskiltes, vaskedes med 100 ml saltlage, tørredes og inddampedes til 7,87 g af et skum. Dette skum opløstes i 10 ml diklormetan og opløsningen rensedes ved søjlekromatografi på 250 g kiselgel ("Merck" [®], 0,05-0,2 mm). Kolonnen elueredes med ca. 1,5 l diklormetan for at fjerne tilbageværende 2,4-dinitrobenzaldehyd og derefter med diklormetan/acetone 50:1; fraktioner med R_f ca. 0,3 (tyndlagskromatografi, "Merck" [®] kiselgel F_{245} plader fremkaldt med toluen/ætylacetat 5:1) forenedes

og inddampedes til tørhed i vakuum. Herved fremkom 3,26 g af den i overskriften angivne ester som et skum. Dette materiale tritureredes med 30 ml æter for at give en renere prøve, 2,677 g, som et lysorange kornet fast stof med smp. 103-112°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{22} = -355^\circ$ ($c = 1,05$ i CHCl_3).

b) (6R,7R)-3-(2,4-Dinitrostyryl)-7-fenoxyacetamidoceph-3-em-4-karboxylsyre, E-isomer (II)

2,0 g af produktet fra eksempel 11 (a) opløstes i en blanding af 8 ml trifluoreddikesyre og 2 ml anisol. Opløsningen holdtes på ca. 23°C i 10 minutter og opløsningsmidlerne fjernedes ved 40°C/2 mm Hg; tilbageværende trifluoreddikesyre fjernedes ved tilsætning og afdampning af 2 x 10 ml toluen og 2 x 10 ml ætylacetat. Remanensen opløstes i 50 ml acetone, opløsningen behandledes med 500 mg trækul og blandingen filtreredes gennem kiselgur. Filtratet inddampedes til 2,63 g af et skum som omrørtes i 15 minutter med 25 ml æter. Det uopløselige materiale frafiltreredes og vaskedes med 2 x 5 ml æter, hvorpå det tørredes ved 40°C i vakuum og gav 1,25 g af den i overskriften angivne syre som et gult kornformet fast stof med smp. 103-120°C (sønderdeling), $[\alpha]_D^{23} = -56,2^\circ$ ($c = 0,107$ i Me_2SO).

Eksempel A

Fremstilling af testreagenser

(a) 50 mg (6R,7R)-3-(E-2,4-dinitrostyryl)-7-(2-tienyl-acetamido)-ceph-3-em-4-karboxylsyre opløstes i 5 ml dimetylformamid og suppleredes op til 100 ml med en fosfatpuffer som gav en pH-værdi på ca. 7,0.

(b) Opløsningen fra (a) imprægneredes i skiver af rent cellulosepapir af den type der egner sig til papirkromatografi. Skiverne lufttørredes i en ovn ved 50°C. Pinde af ren cellulose imprægneredes også og tørredes på lignende måde. Skiverne og pindene oplagredes i desikkatorer under udelukkelse af lys.

Eksempel B

En penicillinresistent stamme af *Staphylococcus aureus* dyrkedes i en næringsvæske i 18 timer ved 37°C. Der tilsattes derefter en tilstrækkelig mængde af opløsningen ifølge eksempel A (a) til at give en koncentration af reagenset på 100 µg/ml.

Der udviklede sig hurtigt en dybrød farve og spektroskopiske undersøgelser viste fremkomsten af et bredt absorptionsbånd ved 485 nm. Samtidig aftog et absorptionsbånd ved 388 nm i intensitet.

Farven var stabil i mindst 24 timer.

Da forsøget gentoges med en opløsning af produktet ifølge eksempel 5 (B), (fremstillet som i eksempel A (a)), iagttoges der en grøn farve.

Eksempel C

Den gramnegative bakterie *Enterobacter cloacae* P 99 og dens mutant P 99 (M) dyrkedes på agar i petriskåle.

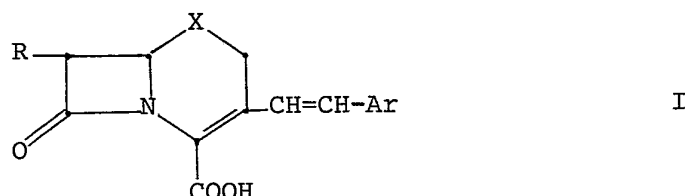
Da kolonierne var fuldt udviklede sættes der til hver plade nogle få dråber af opløsningen ifølge eksempel A (a). Kolonierne af P 99 gav straks en udtalt rød farve, men kolonierne af P 99 (M) gav ingen reaktion. Det vides at P 99 er en β-laktamaseproducerende stamme, hvorimod P 99 (M) ikke er det. Farven var svundet efter 3 timers forløb.

Eksempel D

Staphylococcus aureus (penicillinresistent) dyrkedes på en agarplade. Da kolonien var fuldt udviklet anbragtes en af de imprægnerede skiver ifølge eksemplet A (b) på kolonierne. Den blev hurtigt rød.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til afprøvning af biologiske prøver for β -laktamaseaktivitet, især en bakteriekultur i et flydende medium eller i agar, ved hvilken fremgangsmåde prøven bringes i kontakt med en cephalosporinforbindelse på en sådan måde at der fremkommer en farveindikation for tilstedeværelse af den ringåbnede laktam, k e n d e t e g n e t ved at man i nærværelse af vand bringer den biologiske prøve i kontakt med en cephalosporinforbindelse med den almene formel



hvor R er en amino- eller formamidogruppe eller en gruppe med formlen $R'CH_2CONH-$, $R'OCH_2CONH-$, $R'CONH-$, $R'CHCONH-$ eller $R'C(=O)CONH-$, hvor R' er en arylgruppe, X' en amino- eller beskyttet aminogruppe og R^2 hydrogen eller en alkylgruppe, og hvor Ar er en fenyl-, naftyl-, tienyl-, pyridyl- eller furylgruppe som bærer mindst én nitro- eller cyangruppe i konjugation med den exocykliske $-CH=CH-$ dobbelbinding, og X betegner $-S-$, $-SO-$ (α eller β) eller $-SO_2-$, eller et salt eller en vandopløselig ester deraf.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at saltet er et alkalimetal- eller ammoniumsalt.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved at R i forbindelsen I er en 2-hydroxyimino-2-fenylacetamido-, naftamido-, formamido-, fenylacetamido-, 2-amino-2-fenylacetamido-, tienylacetamido- eller fenoxycetamidogruppe.

4. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved at Ar i forbindelsen I er en fenylgruppe der bærer en eller flere nitro- eller cyangrupper i orto- og/eller parastilling.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved at Ar i forbindelsen I er en 4-cyanofenyl-, 2-nitro-fenyl- eller 4-nitrofenylgruppe.
6. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, k e n d e t e g n e t ved at gruppen Ar i forbindelsen I bærer mindst 2 nitro- og/eller cyangrupper.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved at Ar er en 2,4-dinitrofenyl- eller 2,6-dinitrofenyl-gruppe.
8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at R i forbindelsen I er en fenoxycetamidogruppe og Ar en 2,4-dinitrofenylgruppe.
9. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved at der som forbindelse med den almene formel I eller et salt eller en ester deraf anvendes en trans-isomer.
10. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at der som forbindelse med den almene formel I anvendes (6R,7R)-3-(E-2,4-dinitrostyryl)-7-fenoxycetamidoceph-3-em-4-karboxylsyre eller (6R,7R)-3-(E-2,4-dinitrostyryl)-7-(2-tienylacetamido)-ceph-3-em-4-karboxylsyre eller et salt deraf.
11. Testreagens til anvendelse ved afprøvning for β -laktamaseaktivitet ved den i krav 1 angivne fremgangsmåde, k e n d e t e g n e t ved at det består af et hvidt eller lyst absorbentmateriale imprægneret med en forbindelse med den almene formel I som defineret i krav 1, eller med et vandopløseligt salt eller en vandopløselig ester deraf.
12. Testreagens ifølge krav 11, k e n d e t e g n e t ved at absorbentmaterialet er papir.
13. Testreagens ifølge krav 11, k e n d e t e g n e t ved at forbindelsen med den almene formel I er i form af et vandopløseligt salt.
14. Testreagens til anvendelse ved afprøvning for β -laktamaseaktivitet ved den i krav 1 angivne fremgangsmåde, k e n d e t e g n e t ved at det omfatter en opløsning af en forbindelse med den almene formel I som defineret i krav 1 eller salt eller en ester deraf i en koncentration på 10-2000 $\mu\text{g/ml}$.

15. Testreagens ifølge krav 14, k e n d e t e g n e t ved at opløsningen har en koncentration på 50-250 µg/ml.
16. Testreagens ifølge krav 14 eller 15, k e n d e t e g n e t ved at forbindelsen med den almene formel I eller et salt eller en ester deraf er opløst i vand eller vand indeholdende en mindre mængde af et organisk opløsningsmiddel.
17. Testreagens ifølge krav 16, k e n d e t e g n e t ved at det organiske opløsningsmiddel er dimetylformamid eller dimetylsulfoxyd.

Fremdragne publikationer:
