

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

50665

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 08.IX.1962 (P 99 633)

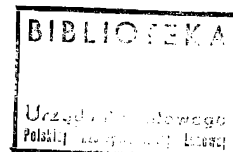
Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 30.I.1966

Kl. 12p, 4/01

MKP C 07 d 99/24

UKD



Współtwórcy wynalazku: Robert Bennet Morin, Billy Grinnel Jackson,
Edwin Harold Flynn, Roger William Roeske

Właściciel patentu: Eli Lilly and Company Indianapolis, Indiana (Stany
Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania kwasu 7-aminocefalosporanowego

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kwasu 7-aminocefalosporanowego z antybiotyków cefalosporyny C.

Cefalosporyny są substancjami antybiotycznymi wytwarzanymi z gatunku *Cephalosporium* sp. ATCC 11,550. Cechą charakterystyczną struktury tych substancji jest podstawiony układ dwupierścieniowy składający się z pierścienia 5,6-dwuhydro-1,3-tiazyny skondensowanego w pozycji 2,3 z pierścieniem beta-laktamowym. Znaną substancją antybiotyczną z tej grupy związków jest cefalosporyna C.

Cefalosporyna C jest kwasem 7-(5'-aminoadypiloamino)-cefalosporanowym o wzorze 1. Sposób wytwarzania tego związku na drodze fermentacji pożywki z odpowiednim szczepem *Cephalosporium* i wyosobnienia cefalosporyny C z produktu fermentacji jest opisany w brytyjskim opisie patentowym nr 810 196.

Cefalosporyna C jest antybiotykiem o niższej aktywności niż penicylina. Jest ona jednak aktywna zarówno wobec Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych ustrojów, jest niewrażliwa na penicylinazy i jest bardziej stabilna w środowisku kwaśnym od penicyliny. Z tych względów związek ten jest bardzo użyteczny do celów terapeutycznych pomimo niskiej aktywności antybiotycznej.

Nie stwierdzono jaka cecha strukturalna cefalosporyny C ma zasadnicze znaczenie dla jej aktywności antybiotycznej, prawdopodobnie gra tu rolę

2

7-aminopochodna dwupierścieniowej cząsteczki. W celu podniesienia aktywności antybiotycznej zainteresowano się wytworzeniem innych 7-aminopochodnych dwupierścieniowego układu cefalosporyny C, które poddawano wstępnym badaniom eliminacyjnym na ich właściwości antybiotyczne. Pochodne takie wytwarza się łatwo drogą acylowania grupy 7-aminowej kwasu 7-aminocefalosporanowego i jego odmian. Dotychczas nie znano sposobu otrzymywania większej ilości kwasu 7-aminocefalosporanowego stanowiącego surowiec wyjściowy dla jego pochodnych. Zagadnienie to rozwiązuje sposób według wynalazku.

Sposób według wynalazku polega na działaniu na związek o dwupierścieniowym układzie cefalosporyny C z grupą 7-aminową związaną z kwasem d-aminoadypinowym jako łańcuchem bocznym, substancją reagującą z grupą 5'aminową łańcucha bocznego, przy czym łańcuch boczny zostaje przekształcony w związek pośredni o niedoborze elektronów przy atomie węgla w pozycji 5', co powoduje jego samorzutną cyklizację, po czym tak utworzoną grupę cykliczną poddaje się hydrolytycznemu odszczepieniu, otrzymując odpowiedni pierścień kwasu 7-aminocefalosporanowego.

Istnieje kilka odmian sposobu według wynalazku. Według jednej odmiany sposobu według wynalazku cefalosporynę C zawieszają się w obojętnym heteropolarnym rozpuszczalniku organicznym, (czyli w takim rozpuszczalniku cefalosporyny C,

który w warunkach procesu nie reaguje w sposób szkodliwy z cefalosporyną C ani z innymi substancjami biorącymi udział w procesie, półproduktami oraz produktami) i zawieszinę tę traktuje się chlorkiem nitrozylu lub innym środkiem nitrozującym w ilości wystarczającej do całkowitego przereagowania grupy 5'-aminowej w łańcuchu bocznym.

Po zakończeniu reakcji nieprzereagowany czynnik nitrozujący rozkłada się lub usuwa. Wartość pH mieszaniny reakcyjnej ustala się na około 2,5—5 przy pomocy rozcieńczonego wodnego ługu w celu hydrolitycznego odszczepienia łańcucha bocznego i utworzenia wewnętrznej soli kwasu 7-aminocefalosporanowego, która krystalizuje. Krystaliczny produkt wyodrębnia się z mieszaniny, przemycza i suszy.

Według innej odmiany sposobu według wynalazku cefalosporynę C rozpuszcza się w odpowiednim rozpuszczalniku i roztwór ten poddaje się reakcji z N-bromosukcynimidem lub inną substancją dającą dodatni chlorowec w ilości wystarczającej do całkowitego przereagowania grupy 5'-aminowej. Produkt tej reakcji cyklizuje w pozycji 5' poprzez tlen grupy amidowej bocznego łańcucha tworząc iminolakton. Cykliczny lakton łatwo odszczepia się hydrolitycznie od azotu grupy iminowej, z którym lakton ten jest związany, tworząc żądany kwas 7-aminocefalosporanowy.

Według innej odmiany sposobu według wynalazku, rozpuszcza się cefalosporynę C w odpowiednim rozpuszczalniku i roztwór ten poddaje się reakcji z chlorkiem benzenodwuazoniowym lub z inną solą aryłodwuazoniową w ilości wystarczającej do przereagowania grupy 5'-aminowej. W wyniku tej reakcji grupa 5'-aminowa przekształca się w liniową trójazynopochodną, która łatwo odszczepia się w temperaturze 0°—100°C, pozostawiając niedobór elektronów w pozycji 5'. Powstały zmodyfikowany łańcuch boczny cyklizuje się na iminolakton, i po hydrolitycznym odszczepieniu tego laktonu od azotu grupy 7-aminowej, z którym jest związany, otrzymuje się żądany kwas 7-aminocefalosporanowy jako produkt końcowy.

Odmiana sposobu według wynalazku z zastosowaniem chlorku nitrozylu jako środka nitrozującego polega na tym, że cefalosporynę C rozpuszcza się w wodnym 98%-owym kwasie mrówkowym o stężeniu około 30%-owego wagowo. Roztwór ten miesza się i ochładza w kąpeli lodowej do temperatury około 10°C, po czym dodaje się chlorek nitrozylu w stosunku molowym do cefalosporyny C około 2:1, przy czym chlorek ten dodaje się porcjami w postaci 10%-owego roztworu w wodnym roztworze 98%-owego kwasu mrówkowego, w ciągu około 1 minuty, w temperaturze poniżej 50°C. Mieszanie prowadzi się jeszcze około 5 minut po zakończeniu dodawania chlorku nitrozylu.

Następnie mieszaninę reakcyjną odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej w celu usunięcia prawie całej zawartości kwasu mrówkowego. Pozostałą substancję miesza się z około 5 objętościami wody i ustala się pH uzyskanego roztworu na około 3,5—4 przy pomocy rozcieńczonego wodnego roztworu wodorotlenku sodowego, dzięki czemu strąca się kwas 7-amino-

cefalosporanowy w postaci jego jonu amfoterycznego, w której to postaci jest on najslabiej rozpuszczalny w wodzie. Uzyskany produkt odsącza się, wymywa wodnym roztworem acetonu i suszy.

Sposób według wynalazku można stosować do traktowania substancji o dwucyklicznym pierścieniu cefalosporyny C włącznie z samą cefalosporyną C, cefalosporyną C_A, cefalosporyną C_C i dez-acetylocefalosporyną C.

Stosowaną jako substancję wyjściową cefalosporynę C używa się w postaci surowej oczyszczonej i (albo) w postaci wolnego kwasu lub jego soli, zależnie od rozpuszczalności w środowisku reakcyjnym. Odpowiednimi solami są sól sodowa, potasowa, litowa i sole innych metali. Można również zastosować sole cefalosporyny C i podstawione sole amonowe, takie jak sól jednometyloamonowa, dwumetyloamonowa, dwuetyloamonowa, dwuizopropylomonowa, trójmetyloamonowa, czterometyloamonowa, czteroetyloamonowa, metyldwuizopropylomonowa itp. Spośród nich najkorzystniejszymi są trzecio- i czwartorzędowe sole amonowe ze względu na ich mniejszą wrażliwość na substancje biorące udział w reakcji.

Korzystnym środowiskiem reakcyjnym jest heteropolarna ciecz organiczna, obojętna w stosowanych warunkach reakcji, w której przynajmniej częściowo rozpuszcza się cefalosporynę C. Przez ciecz obojętną rozumie się taką, która nie reaguje z substancjami wyjściowymi, substancjami reakcyjnymi i produktami reakcji w warunkach, w których przebiega proces. Cefalosporyna C powinna rozpuszczać się w środowisku reakcyjnym w ilości co najmniej 0,5% wagowych, lecz zasadniczo reakcje można przeprowadzić już w środowiskach, w których rozpuszczalność cefalosporyny C wynosi zaledwie 0,1% wagowych.

W zależności od zastosowanego reagentu, mieszanina reakcyjna może zawierać mniej lub więcej wody, przy czym przy zastosowaniu środków nitrozujących środowisko reakcyjne, nie powinno zawierać więcej niż 25% wagowych wody, korzystnie nie więcej niż 10% wagowych. Przy zastosowaniu soli benzenodwuazoniowych środowiskiem reakcyjnym może być w całości woda. Korzystnym środowiskiem reakcyjnym przy zastosowaniu środka nitrozującego jest kwas mrówkowy.

Innymi środowiskami odpowiednimi dla różnych reagentów są kwas octowy, kwas propionowy, kwas trójfluorooctowy, siarczany dwumetylowy itp. Można również stosować mieszane środowiska reakcyjne takie jak mieszaniny kwasu mrówkowego z kwasem octowym, kwasu octowego z bezwodnikiem octowym, dwumetyloformamid z wodą, acetonitrylu z wodą, siarczany dwumetylowego z wodą itp.

Odpowiednimi substancjami, które mogą być zastosowane do reakcji odbudowy łańcucha bocznego znajdującego się w położeniu 7 są: 1) czynniki nitrozujące jak chlorek nitrozylu, bromek nitrozylu, kwas azotawy, dwutlenek azotu, czterotlenek azotu, trójtlenek azotu (NONO₂), azotyny alkilowe, N-nitrozo-3-nitrokarbazol, kwas nitrozylosiarkowy, fluoroboran nitrozylu itp., przy czym korzystnym czynnikiem jest chlorek nitrozylu; 2) substancje

dające dodatni halogen w warunkach reakcji jak N-bromosukcynimid, N-chlorosukcynimid, N-bromoftalimid, N-chloroftalimid, N-bromoacetamid itp. oraz 3) sole aryldwuazoniowe takie jak chlorek benzenodwuazoniowy, chlorek naftalenodwuazoniowy itp.

Ilość stosowanego reagentu winna być co najmniej równomolowa dla wejścia w reakcję z grupą 5'-aminową cefalosporyny C. Korzystne jest zastosowanie stosunku molowego 2:1, jeżeli środowisko reakcyjne jest bezwodne lub prawie bezwodne. Natomiast, jeżeli środowisko to zawiera wodę, to w tych warunkach, zarówno grupa 5'-aminowa łańcucha bocznego jak i grupa 7-aminowa znajdująca się przy pierścieniu jest podatna na działanie reagentu, co powoduje możliwość rozkładużądanego produktu. W tym przypadku pożądane jest ograniczenie reagentu do takiej ilości, przy której następuje całkowite przekształcenie grupy 5'-aminowej, grupa 7-aminowa natomiast jest nie-naruszona. W środowisku wodnym pożądane jest na ogół ograniczenie molowego stosunku reagentu do cefalosporyny C do poniżej 2:1, na przykład 1,1:1—1,5:1.

Odbudowy łańcucha bocznego dokonuje się dogodnie w temperaturze zbliżonej do pokojowej, np. 20°—30°C. Dopóki mieszanina reakcyjna pozostaje płynna, można stosować niższą temperaturę, na przykład —10°C lub niższe. Wyższa temperatura (powyżej 50°C) powoduje zmniejszenie wydajności wskutek reakcji rozkładowych. Krótki czas reakcji sprzyja uzyskiwaniu wysokiej wydajności, a zatem korzystne jest jak najszybsze dodawanie reagentu, korzystnie w czasie 1—5 minut lub krótszym i jak najkrótsze pozostawianie produktu reakcji w kontakcie z nieprzereagowanym reagentem.

Jeżeli mieszanina reakcyjna zawiera wodę, to produkt cyklizacji łańcucha bocznego samorzutnie ulega hydrolitycznemu odszczepieniu przy azocie aminowym, z którym jest związany, dając żądany kwas 7-aminocefalosporanowy. Kiedy mieszanina reakcyjna zawiera niewielką ilość lub wcale nie zawiera wody, odszczepienia dokonuje się przez dodanie wody.

Jeżeli po zakończeniu reakcji pozostaje w mieszaninie nieprzereagowany czynnik nitrozujący, wówczas można go usunąć przez destylację, o ile czynnik ten jest dostatecznie lotny albo przez rozkład za pomocą dostatecznej ilości amoniaku, pierwszorzędowej aminy lub mocznika wprowadzonych do mieszaniny reakcyjnej. Substancje te, o ile nie występują w znacznych ilościach, nie przeszkadzają w wyosobnieniu kwasu 7-aminocefalosporanowego.

Kwas 7-aminocefalosporanowy wyosabnia się łatwo z masy poreakcyjnej wieloma sposobami.

Według jednego z nich, środowisko reakcji odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem w normalnej temperaturze a pozostały surowy produkt reakcji w postaci oleju, paki, żywicy lub substancji stałej rozpuszcza się w wodzie, co hydrolizuje produkt odbudowy. Do roztworu tego dodaje się wodny roztwór wodorotlenku sodowego lub inny roztwór alkaliczny do ustalenia wartości pH około 2,5—5, korzystnie około 3,7. Kwas 7-aminocefalo-

sporanowy strąca się wtedy w postaci jonu amfoterycznego, który odsącza się, wymywa kolejno zimną wodą i wodnym roztworem acetonu i suszy.

Według innego sposobu, produkt reakcji, po hydrolitycznym odszczepieniu przy pomocy dostatecznej ilości wody, rozcieńcza się antyrozpuszczalnikiem kwasu 7-aminocefalosporanowego w ilości wystarczającej do strącenia tego kwasu. Surowy produkt odsącza się, odwirowuje itp. i oczyszcza przez rozpuszczenie w wodzie i ponowne strącenie przy pH = 2,5—5.

Przykładowo, produkt otrzymany w wyniku reakcji z zastosowaniem 90%-owego kwasu mrówkowego jako środowiska reakcyjnego rozcieńcza się 1—5 objętościami eteru dwuetylowego, przy czym strąca się surowy kwas 7-aminocefalosporanowy. Kwas ten wyosobnia się, rozpuszcza w wodzie, ustala się pH = 3,7 i rekrystalizuje. Eter wyosobnia się z kwasu mrówkowego, po czym zarówno eter jak i kwas mrówkowy zwraca się do obiegu.

Według innej odmiany tego sposobu, wodny roztwór surowego kwasu 7-aminocefalosporanowego traktuje się węglem aktywowanym, który adsorbuje kwas 7-aminocefalosporanowy. Węgiel przemycia się wodą, po czym kwas 7-aminocefalosporanowy eluuje się wodnym 10—40%-owym acetonem.

Według jeszcze innej odmiany postępowania, wodny roztwór surowego kwasu 7-aminocefalosporanowego przepuszcza się przy pH = 6—7 przez silną żywicę anionitową, po czym żywicę przemycia się wodą i kwas 7-aminocefalosporanowy eluuje się z niej wodnym roztworem kwasu octowego przy stężeniu wzrastającym do około 1 n.

Kwas 7-aminocefalosporanowy można wydzielić z surowego produktu reakcji, również przez dodanie do produktu reakcji wody i przez oddestylowanie ze środowiska reakcyjnego azeotropowej mieszaniny produktu z wodą pod zmniejszonym ciśnieniem i przy normalnej temperaturze. Otrzymuje się przy tym wodny roztwór, z którego jednym z powyższych sposobów wyosobnia się kwas 7-aminocefalosporanowy.

Według innego sposobu, wodny roztwór surowego kwasu 7-aminocefalosporanowego acyluje się w normalnych warunkach tworząc odpowiedni kwas 7-acyloaminocefalosporanowy. Można tu stosować różne czynniki acylujące jak chlorek acetylu, chlorek fenylacetynu, chlorek fenylomerkaptoacetynu, odpowiednie bromki itp. W celu przeprowadzenia acylacji dodaje się równe objętości acetonu do wodnego kwasu 7-aminocefalosporanowego, po czym wprowadza się czynnik acylujący, w roztworze acetonowym korzystnie w stosunku równomolowym.

Acylowanie zachodzi łatwo i szybko w temperaturze pokojowej, przy czym pH utrzymuje się w granicach = 5—9. Z uzyskanej acylowej pochodnej otrzymuje się dogodnie kwas 7-aminocefalosporanowy przez ekstrahowanie przy pH = 2 rozpuszczalnikiem organicznym, takim jak octan etylowy. Acylowa pochodna może być dodatkowo oczyszczana przez ekstrakcję ponownie rozpuszczalnikiem organicznym z dodatkiem rozcieńczonego ługu przy pH = 5,5—7,5, odparowanie roztwo-

ru pod zmniejszonym ciśnieniem i krystalizację produktu. Tożsamość produktu potwierdza analiza w podczerwieni lub w nadfiolecie, elektroforeza bibułowa i chromatografia bibułowa z towarzyszącą analizą bioautograficzną.

Produkt końcowy ma strukturę o wzorze 2, w którym **R'** oddzielnie oznacza grupę **—OH**, grupę acyloksylową o 1—8 atomów węgla, lub czwartorzędową grupę aminową **R''** oznacza **—OH** kiedy **R'** oznacza **—OH**, **R''** oznacza grupę **—OH**, kiedy **R'** oznacza grupę acyloksylową o 1—8 atomów węgla, **R''** oznacza **—O—** kiedy **R'** oznacza czwartorzędową aminę, a **R', R''** jednocześnie oznaczają **—O—**. **R'** może oznaczać grupę acetoksy propionoksy, butyrokso, kapryloksy, N-pirydyli, N-pirymidyli, grupę trójmetyloaminową, trójetyloaminową, trójbutyloaminową itp.

Kwas 7-aminocefalosporynowy ma budowę o wzorze 2, w którym **R'** oznacza grupę acetylową, a **R''** oznacza **—OH**. W pierścieniu cefalosporyny **C_A** **R'** oznacza czwartorzędową aminę a **R''** oznacza **—O—**. W pierścieniu cefalosporyny **C_C**, **R'** i **R''** jednocześnie oznaczają **—O—** tworząc w pozycji 4,5 skondensowany z pierścieniem lakton.

Cefalosporynę **C** przekształca się łatwo w cefalosporynę **C_C** przez ogrzewanie pod chłodnicą zwrotną w wodnym roztworze kwasów, jak opisał w belgijskim opisie patentowym nr 593777. W ten sposób usuwa się grupę acetylową z punktu jej przyłączenia do grupy metylenowej w pozycji 5 pierścienia tiazyny, przy czym następuje samorzutna laktonizacja dająca skondensowany w pozycji 4, 5 lakton.

Cefalosporynę **C** przekształca się również łatwo w cefalosporynę **C_A** przez ogrzewanie w wodnym roztworze z nadmiarem pirydyny, na przykład jak opisano w wyżej wymienionym belgijskim opisie patentowym. Reakcję tę stosuje się do czwartorzędowych amin otrzymując odpowiednie pochodne cefalosporyny **C_A**, w których czwartorzędowa amina jest przyłączona do grupy metylenowej w pozycji 5 pierścienia tiazyny i tworzy wewnętrzną sól z grupą karboksylową w pozycji 4. Tak więc, pochodne cefalosporyny **C_A** można wytworzyć przez poddanie reakcji cefalosporyny **C** z nikotyną, kwasem nikotynowym, kwasem izonikotynowym, amidem kwasu nikotynowego, 2-aminopirydyną, 2-amino-6-metylopirydyną, 2,4,6-trójmetylopirydyną, 2-hydroksymetylopirydyną, sulfopirydyną, 3-hydroksypirydyną, kwasem pirydyno-2,3-dwukarboksylowym, chinoliną, sulfadwiazyną, sulfatiazolem, kwasem pikolinowym itp.

Dezacylocefalosporynę **C** wytwarza się dogodnie przez kilkugodzinne traktowanie cefalosporyny **C** cytrusową acetyloesterazą w wodnym buforze fosforanowym przy wartości pH = 6,5—7, według metody Jansena, Janga i MacDonella, (Archiv. Biochem. 1947 — 48, 1516).

Poniższe przykłady bliżej objaśniają sposób wyizolacji.

Przykład I. 40 g cefalosporyny **C** rozpuszczono w 150 ml 98%-owego kwasu mrówkowego i roztwór ten przesączono przez Celit, przy czym filtr i kolbę wymyło 20 ml kwasu mrówkowego. Następnie połączono przesącz i ciecz po płukaniu

ochłodzono, mieszając w kąpieli lodowej, po czym w ciągu 2 minut dodano zimny roztwór 11,1 g chlorku nitrozyli w 100 ml 98%-owego kwasu mrówkowego. Mieszaninę tę mieszano ochładzając w ciągu dalszych 3 minut, po czym zagęszczono przez odparowanie w obrotowej wyparce w temperaturze pokojowej i pod zmniejszonym ciśnieniem.

Masę tę rozpuszczono w 150 ml wody, ochłodzono roztwór w kąpieli lodowej i wkropiono, mieszając stężony amoniak do uzyskania pH = 3,5, przy czym wytrącił się osad. Uzyskaną mieszaninę pozostawiono w kąpieli lodowej przez 0,5 godziny i odsączono. Osad wymyło dwukrotnie na filtrze niewielkimi porcjami zimnej wody, a następnie dwukrotnie zimnym acetonem i wysuszono. Otrzymano 6,14 g suchego produktu o maksimum w nadfiolecie przy 264 m μ (ϵ = 7900). Produkt ten zidentyfikowano jako kwas 7-aminocefalosporynowy na podstawie chromatografii bibułowej i próby bioautograficznej.

Przykład II. 5 g cefalosporyny **C** rozpuszczono w 300 ml lodowatego kwasu octowego i w ciągu 1 minuty dodano 1,4 g chlorku nitrozyli w około 50 ml kwasu octowego lodowatego w normalnej temperaturze, po czym w ciągu 10 minut mieszano mieszaninę i odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem i w temperaturze pokojowej. Następnie dodano około 100 ml wody destylowanej uzyskując czysty pomarańczowo-czerwony roztwór, do którego dodano rozcieńczony wodny roztwór wodorotlenku sodowego do pH = 3,5. Roztwór ten stężono w temperaturze pokojowej i pod zmniejszonym ciśnieniem do około 20—30 ml kiedy nastąpiło strącenie osadu. Osad ten odsączono, przemyto wodą i acetonem i wysuszono. Produkt ten, który ważył 194 mg i wykazywał maksimum w nadfiolecie przy 263 m μ (ϵ = 7820), zidentyfikowano jako kwas 7-aminocefalosporynowy na podstawie chromatografii bibułowej i próby bioautograficznej.

Przykład III. 10 mg cefalosporyny **C** rozpuszczono w 0,5 ml kwasu octowego lodowatego i do tego roztworu dodano 0,36 ml roztworu N_2O_4 w kwasie octowym lodowatym o stężeniu 0,059 milimola N_2O_4 na mililitr lodowatego kwasu octowego. Mieszaninę tę utrzymywano w ciągu 20 minut w kąpieli lodowej w temperaturze 15°—16°, po czym odparowano ją do stanu prawie suchego w temperaturze pokojowej i pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskano 13 mg osadu, który rozpuszczono w minimalnej ilości wody i roztwór ten o pH = 2,5 zadano wodnym roztworem wodorotlenku sodowego, w celu doprowadzenia wartości pH do 7,3, po czym rozcieńczono do 10 ml wodą destylowaną i poddano analizie. Chromatografia bibułowa i próba bioautograficzna roztworu, po acyloowaniu chlorkiem i fenoksyacetylu wykazała dwie plamy biologiczne aktywne, podczas gdy przed acyloowaniem była tylko jedna plama. Potwierdza to obecność kwasu 7-aminocefalosporynowego.

Przykład IV. Roztwór 10 mg cefalosporyny **C** w 10 ml kwasu octowego lodowatego zmie-

szano z roztworem 5 mg N-nitrozo-3-nitrokarbazolu w 6 ml acetonitrylu i mieszaninę tę utrzymywano w ciągu 1 godziny w temperaturze 60°C, po czym wysuszono ją do stanu prawie suchego pod zmniejszonym ciśnieniem i w łagodnej temperaturze. Uzyskany osad rozpuszczono w wodzie i ekstrahowano octanem etylowym przy pH = 2, a następnie osad ekstrahowano z octanu etylowego w wodnym roztworze wodorotlenku potasowego przy pH = 5,5. Końcowy roztwór rozcieńczono do 10 ml i poddano analizie. Chromatografia bibułowa i próba bioautograficzna wykazały obecność kwasu 7-aminocefalospiranowego o stężeniu odpowiadającym 1,1 jednostek penicyliny G na 1 mililitr wodnego roztworu.

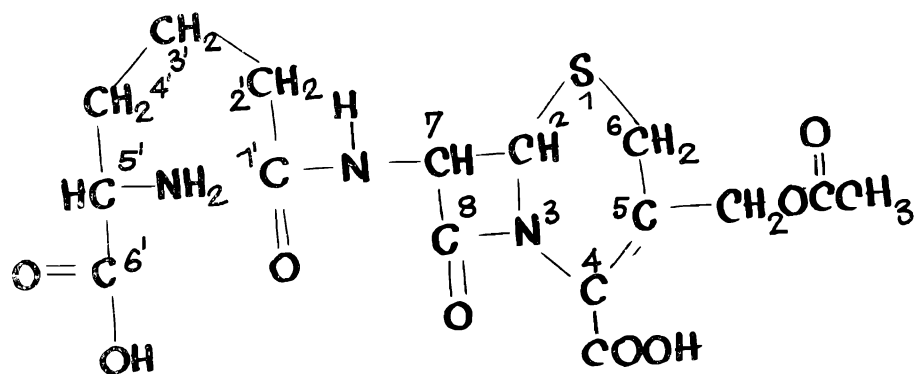
Przykład V. 800 mg cefalosporyny C rozpuszczono w 35 ml wody przy pH = 5,3 i roztwór doprowadzono do wartości pH poniżej 2,2 przez dodanie 1 n kwasu solnego i do roztworu tego dodano 300 mg N-bromosukcynimidu, po czym mieszało się w ciągu 10 minut w temperaturze pokojowej, w którym to czasie mieszanina nabierała żółtego zabarwienia. Następnie przez dodanie wodnego 1 n roztworu wodorotlenku potasowego ustalono wartość pH na 6,7 i odsączono mieszaninę w celu usunięcia substancji nierozpuszczalnych. Przesączając odparowano do stanu suchego pod zmniejszonym ciśnieniem w normalnej temperaturze. Otrzymano 770 mg produktu, który, jak wykazały chromatografia bibułowa i próba bioautograficzna, zawierał kwas 7-aminocefalospiranowy.

Zastrzeżenia patentowe

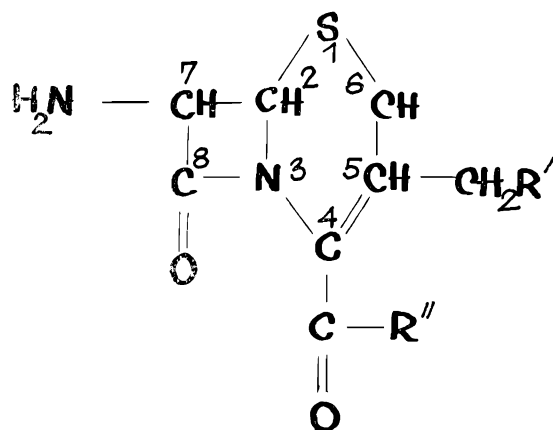
1. Sposób wytwarzania kwasu 7-aminocefalospiranowego, **znamienny tym**, że na związek o dwupierścieniowym układzie cefalosporyny C z grupą 7-aminową związaną z kwasem alfa-amino-adypinowym jako łańcuchem bocznym działa się w środowisku rozpuszczalnika polarnego substancją reagującą z grupą 5'-aminową łańcucha bocznego, przy czym łańcuch boczny zostaje przekształcony w układ pośredni o niedoborze elektronów przy atomie węgla w pozycji 5', co powoduje jego cyklizację samorzutną, po czym tak utworzoną grupę cykliczną odszczepia się hydrolitycznie od atomu azotu grupy 7-aminowej, z którym jest ta grupa związana, otrzymując odpowiedni pierścień kwasu 7-aminocefalospiranowego.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że na cefalosporynę C działa się solą aryldwuzaniową.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że na cefalosporynę C działa się substancją oddającą chlorowec w warunkach reakcji, w ilości

wystarczającej do wejścia w reakcję z grupą aminową w pozycji 5'.

4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako substancję oddającą chlorowec stosuje się N-bromosukcynimid.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że na cefalosporynę C działa się czynnikiem nitrozującym w ilości wystarczającej do wejścia w reakcję z grupą aminową w pozycji 5'.
6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że jako czynnik nitrozujący stosuje się czterotlenek azotu.
7. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że jako czynnik nitrozujący stosuje się N-nitrozo-3-nitrokarbazol.
8. Sposób według zastrz. 1 i 5, **znamienny tym**, że cefalosporynę C traktuje się w obojętnym organicznym rozpuszczalniku heteropolarnym czynnikiem nitrozującym w temperaturze poniżej 50°C, przy zachowaniu stosunku molowego czynnika nitrozującego do cefalosporyny C powyżej 1:1, po czym usuwa się rozpuszczalnik z produktu reakcji, pozostałą mieszaninę rozpuszcza się w wodzie, ustala się pH roztworu na 2,5—5 i krystalizuje się z tego roztworu kwas 7-aminocefalospiranowy.
9. Sposób według zastrz. 8, **znamienny tym**, że czynnik nitrozujący wprowadza się do cefalosporyny C w stosunku molowym 2:1 a pH wodnego roztworu doprowadza do wartości 3,5—4.
10. Sposób według zastrz. 1, 5—9, **znamienny tym**, że jako obojętny heteropolarny rozpuszczalnik organiczny stosuje się kwas octowy.
11. Sposób według zastrz. 1, 5—9, **znamienny tym**, że jako rozpuszczalnik stosuje się kwas mrówkowy.
12. Sposób według zastrz. 1, 5 i 11, **znamienny tym**, że cefalosporynę C rozpuszcza się w kwasie mrówkowym, do powstałego roztworu wprowadza się jako czynnik nitrozujący chlorek nitrozyłu w stosunku molowym do cefalosporyny C 2:1, w temperaturze poniżej 50°C, korzystnie 20—30°C, po czym oddestylowuje się kwas mrówkowy z produktu reakcji pod zmniejszonym ciśnieniem w normalnej temperaturze, a pozostałą mieszaninę rozpuszcza się w wodzie, doprowadza pH roztworu do wartości 3,5—4 i krystalizuje kwas 7-aminocefalospiranowy.
13. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że stosuje się kwas mrówkowy zasadniczo bezwodny.



WZÓR 1



WZÓR 2