



(11) FREMLÆGGESESSKRIFT 142950

DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(51) Int. Cl.³ C 07 D 501/22
C 07 D 501/12

(21) Ansøgning nr. 267/72 (22) Indleveret den 19. jan. 1972

(24) Løbedag 19. jan. 1972

(44) Ansøgningen fremlagt og
fremlæggesesskriftet offentliggjort den 2. mar. 1981

(30) Prioritet begæret fra den
20. jan. 1971, 108218, US

-
- (71) ELI LILLY AND COMPANY, 307 East McCarty Street, Indianapolis, Indiana, US.
- (72) Opfinder: William Lee Garbrecht, 4114 Ponderosa Boulevard, Indianapolis, Indiana, US.

- (74) Fuldmægtig under sagens behandling:
Ingeniørfirmaet Hofman-Bang & Boutard.
-

- (54) Cephalalexinkompleks til anvendelse som mellemprodukt til fremstilling af cephalalexin samt fremgangsmåde til fremstilling af et sådant kompleks.

Den foreliggende opfindelse angår et cephalalexinkompleks til anvendelse som mellemprodukt til fremstilling af cephalalexin, hvilket kompleks er ejendommeligt ved det i krav 1's kendetegnende del anførte. Opfindelsen angår endvidere en fremgangsmåde til fremstilling af dette kompleks, og denne fremgangsmåde er ejendommelig ved det i krav 3's kendetegnende del anførte.

Cephalalexinkomplekset ifølge opfindelsen er særligt anvendeligt som mellemprodukt i processer til fremstilling af cephalalexin ved de-esterificering af cephalalexinestere, specielt ved fjernelse af p-nitrobenzyl- eller 2,2,2-trichlorethylester-grupper fra cephalalexin-

kernen. Ved en sådan metode fremstiller man en cephalalexinester, hvori estergruppen kan fjernes med syre.

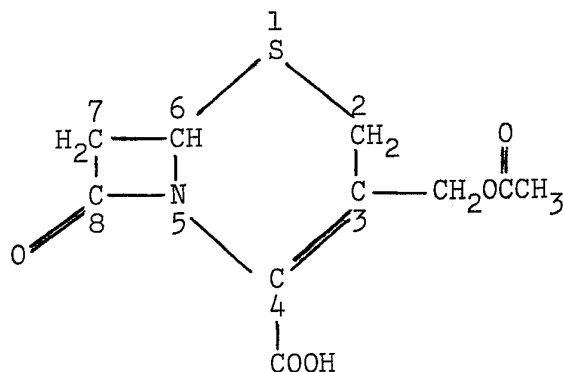
Til fremstilling af visse cephalosporansyrederivater har man udviklet procesveje til acylering af 7-aminogruppen i en cephalosporinkerneester med en acyleret form af den ønskede syre. Når acylerings-trinnet er tilendebragt, må enhver beskyttende gruppe og estergruppen fjernes fra cephalosporinderivatet for at opnå det ønskede cephalosporinantibiotikum. Ofte udføres acyleringen og deesterificeringen i et enkelt opløsningsmiddelsystem. Af bekvemmelighedsgrunde og for at få et forbedret udbytte foretrækkes det i nogle tilfælde at anvende p-nitrobenzyl som estergruppe på cephalosporinkernen i denne proces. I en sådan proces fremstilles for eksempel en p-nitrobenzyl-ester af 7-aminodesacetoxycephalosporansyre (7-ADCA) eller et p-toluensulfonatsalt deraf, og dette anvendes som kerneforbindelse til fremstilling af cephalalexin, hvilket antibiotikum er beskrevet i U.S.A. patentskrift nr. 3 507 861.

En metode, der på nuværende tidspunkt anvendes til fremstilling af cephalalexin, består i at acylere p-nitrobenzylesteren af 7-aminodesacetoxycephalosporansyre (7-ADCA-ester) i acetonitril med et C_1 - C_4 -alkyl-phenylglycinanhydrid, hvori aminonitrogenet er beskyttet med enaminen fra methylacetoacetat. Man fjerner nu estergruppen fra carboxylsyregruppen ved at behandle acetonitrilblandingen af cephalalexinesteren med et reducerende middel, f.eks. metallisk zinkstøv og syre. Dette syrereduktionstrin, der også fjerner enaminen, efterfølges af en basebehandling for at øge pH i blandingen til ca. 4,5 - 5,0, ved hvilken pH-værdi man får en udfældning af den rå cephalalexin som en zwitterion.

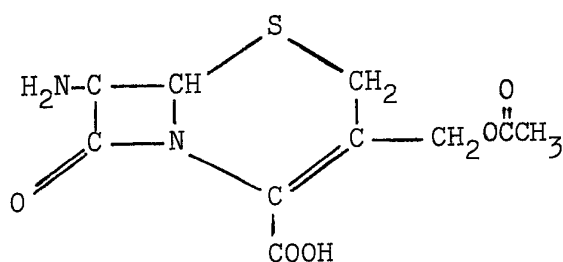
Selv om denne syrereduktion er meget effektiv til spaltning af p-nitrobenzylestergruppen, produceres der samtidig visse urenheder, der er svære at fjerne fra cephalalexin-zwitterionen. Blandt sådanne urenheder mener man, at der er små mængder af 7-ADCA, phenylglycin

og, når man anvender p-nitrobenzylester, en urenhed, hvis struktur man endnu ikke kender med sikkerhed. Uanset den kemiske struktur indeholder den sidstnævnte urenhed diazoterbart nitrogen som målt ved Bratton-Marshall-metoden beskrevet nedenfor. Fagmanden ville foretrække at eliminere eller i det mindste at reducere mængden af diazoterbart nitrogen til et ubetydeligt niveau i cephelex-inproduktet.

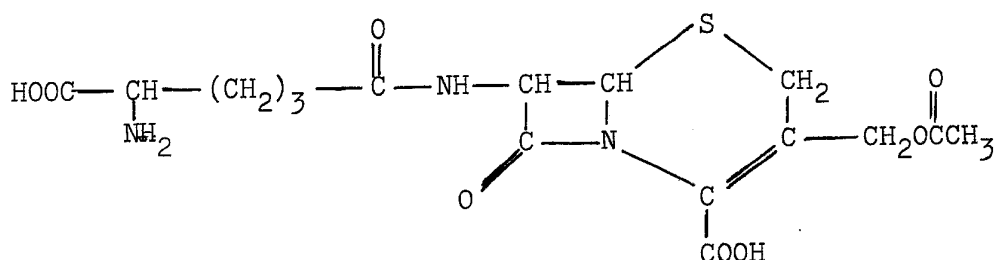
Nogle af forbindelserne, der anvendes som reaktanter, samt de omhandlede komplekser er nævnt som derivater af cephalosporansyre, der har følgende struktur:



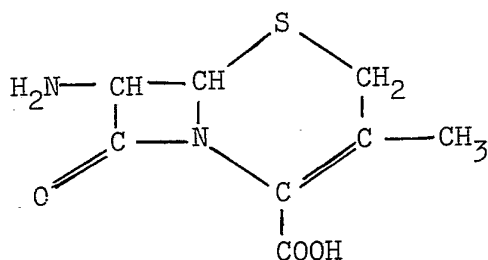
Således har 7-aminocephalosporansyre (7-ACA) strukturen



7-ACA er et vigtigt mellemprodukt opnået ud fra cephalosporin C



ved spaltning af 7-acyl-sidekæden på kendt måde. Andre af de i denne beskrivelse omtalte forbindelser benævnes som derivater af 7-aminodesacetoxycephalosporansyre (7-ADCA)



7-aminodesacetoxycephalosporansyre kan også kaldes 7-amino-3-methyl- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre. På lignende måde kan cephalixin kaldes 7-[D- α -amino- α -phenylacetamido]-3-methyl- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af det omhandlede cephalexinkompleks er ejendommelig ved, at man (a) blander en cephalixinester eller et salt deraf indeholdende en fri primær aminogruppe eller en aminblokerende gruppe med N,N-dimethylformamid (DMF) eller N,N-dimethylacetamid (DMAC), (b) behandler blandingen med et reduktionsmiddel i en syre (pH under 5) og (c) blander basisk forbindelse med den fremkomne blanding fra trin (b), indtil der udfælder et kompleks af den aminogruppeholdige cephalixin og DMF eller DMAC. Dette kompleks (d) opløses i et medium af N,N-dimethylformamid, og (e) blandingen fra trin (d) blandes med en basisk forbindelse for at øge pH, indtil komplekset af cephalixin og N,N-dimethylformamid eller N,N-dimethylacetamid udfælder. Denne oprensning kan gentages en eller flere gange, indtil indholdet af ureagerede reaktanter, såsom cephalixinforbindelse, eller biprodukter, såsom urenheder indeholdende diazoterbart nitrogen, er reduceret til et acceptabelt lavt niveau. Den fri cephalixin-zwitterion kan dernæst regenereres fra det oprensede cephalexinkompleks ved at opløse i vand eller vandigt acetonitril og tilsætte en base til indstilling af pH til det isoelektriske pH af cephalixin-zwitterionen i blandingen, hvorved denne udfælder. Cephalexinkomplekserne kan om ønsket omdannes til hydrerede, krystallinske produkter, idet man opløser dem i surt vand, opvarmer opløsningen til 40-70° C

og dernæst blander opløsningen med et basisk middel, indtil hydratet af cephalixin-zwitterionen udfælder.

Den i krav 3 omhandlede fremgangsmåde kan anvendes som en del af den totale proces til fremstilling af cephalixin.

Ved fremgangsmåden går man frem som følger:

- (1) 7-ADCA-esteren, f.eks. p-nitrobenzyl- eller 2,2,2-trichlor-ethylesteren, acyleres i acetonitril med et blandet anhydrid af phenylglycin, en substitueret phenylglycin, 2-thienylglycin eller lignende, hvori aminonitrogenet i glycindelen er beskyttet med en enamin af methylacetoacetat eller en anden beskyttende gruppe, såsom tert.-butoxycarbonyl.
- (2) Produktet fra trin (1) behandles med en egnet syre til udfældning af saltet af cephalixinesteren. En aromatisk carbonhydridsulfonsyre med 6 - 12 carbonatomer, såsom p-toluensulfonsyre, foretrakkes til dette formål. Ved en sådan syrebehandling fjernes methylacetoacetatenaminen fra aminonitrogenet.
- (3) Cephalixinesteren eller saltet deraf fra trin (2) separeres fra acetonitrilmediet, f.eks. ved filtrering, centrifugering eller på anden kendt måde.
- (4) Den N-enamin-blokerede cephalixinester eller saltet deraf opløses i N,N-dimethylformamid (DMF) eller N,N-dimethylacetamid (DMAC).
- (5) Opløsningen fra trin (4) behandles med et reduktionsmiddel, f.eks. metallisk zink, der af bekvemmelighedsgrunde er findelt. Alternativt kan reduktionsmidlet være hydrogen under kendte hydrogeneringsbetingelser i nærværelse af en hydrogeneringskatalysator, såsom palladium eller rhodium på en carbon- eller bariumsulfatbærer eller en palladium- eller rhodiumforbindelse suspenderet i det medium, der skal hydrogeneres. Enhver ikke-oxiderende syre kan anvendes til tilvejebringelse af syremedit, men saltsyre foretrakkes. En sådan behandling fjerner også visse aminonitrogenbeskyttende grupper, hvis disse ikke er fjernet på et tidligere trin i

processen. Reaktionen fuldendes i det væsentlige på kort tid, men i praksis omrøres blandingen eller henstår i nogle få timer for at fuldstændiggøre reaktionen og for at tillade enhver remanens og ureageret zink at bundfælde. Reaktionsblandingen kan dernæst separeres fra remanensen ved filtrering, dekantering, centrifugering eller på lignende måde.

(6) Reaktionsblandingen fra trin (5) behandles dernæst med en tilstrækkelig mængde base til at øge pH til et niveau, ved hvilket cephalalexin udfælder som et kompleks med DMF eller DMAC. Når man anvender DMF som eneste opløsningsmiddel, udfælder cephalalexin-bis-(DMF)-komplekset ved en pH-værdi på 6,9. Med DMF-blandinger kan komplekset udfælde ved en pH-værdi fra ca. 6,5 til 7,5. Enhver almindelig base kan anvendes til behandling af reaktionsblandingen. Valget afhænger normalt af omkostningerne, tilgængeligheden og farligheden af stoffet. Det foretrækkes at anvende ammoniak, ammoniumhydroxid eller en N,N,N-tris(C_1 - C_4 -alkyl)amin, såsom triethylamin. Imidlertid kan man også anvende de mere økonomiske alkalimetallhydroxider, f.eks. natriumhydroxid eller kaliumhydroxid.

Komplekserne af cephalalexin med DMF eller DMAC er hidtil ukendte, krystallinske forbindelser, der har alle en kemisk forbindelses karakteristika. De giver et røntgenbillede, der er karakteristisk for en krystallinsk forbindelse. For eksempel viser cephalalexin-bis-(DMF) et indhold på 70 - 72 % cephalalexin og 28 - 30 % DMF ved ultraviolet spektralanalyse og er stabil ved stuetemperatur. Det kan tørres ved 30 - 50° C til konstant vægt.

De omhandlede cephalalexinkomplekser med DMF eller DMAC kan yderligere renses ved opløsning i en sur blanding af et udvalgt N,N-dialkylacylamid og op til 40 volumenprocent af et polært opløsningsmiddel. Med det foretrukne opløsningsmiddel DMF består en foretrukken blanding af 90 % DMF og ca. 10 % vand. Andre polære opløsningsmidler, som kan anvendes, omfatter alkanoler med 1 - 3 carbonatomer, såsom methanol, ethanol eller isopropanol, og andre forbindelser, såsom acetone, acetonitril, nitromethan eller methylethylketon. Alternativt kan cephalalexin-DMF-komplekset renses ved at opløse det i

den polære væske med syre, og den fremkomne opløsning kan dernæst behandles med DMF eller DMAC. Generelt tilsættes en ikke-oxiderende syre, såsom saltsyre, for at forøge opløsningshastigheden. Der tilsættes en egnet base, såsom ammoniumhydroxid eller triethylamin, for at øge pH til det niveau, hvor cephalixin-solvat-komplekset udfælder effektivt. Med cephalixin-bis(DMF) foretrækkes en pH-værdi på 6,5 - 7,5. Denne oprensningss metode kan gentages en eller flere gange, indtil cephalexinkomplekset viser et ønsket lavt indhold af diazoterbart nitrogen og andre uønskede urenheder. Fortrinsvis gentages denne procedure, indtil mængden af diazoterbart nitrogen er mindre end 0,1 %. Cephalexinkomplekserne ifølge den foreliggende opfindelse og fremgangsmåden til fremstilling heraf kan som nævnt anvendes til fremstilling af cephalixin, et kendt antibiotikum. Til dette formål opløses cephalixin-bis(DMF eller DMAC) i vand, og der tilsættes syre for at mindske pH til 1 - 2. Blandingen opvarmes til 40 - 70° C, fortrinsvis 50 - 60° C, til dannelse af monohydratet, og dernæst tilsættes en base, såsom ammoniumhydroxid eller triethylamin, for at øge pH til det punkt, hvor monohydratet af cephalixin-zwitterionen udfælder. Normalt sker dette ved pH 4,5 - 5,0, men det afhænger af det anvendte opløsningsmiddelsystem. Hvis man ønsker at opnå ikke-opløst cephalixin, kan komplekset opløses i og udvindes fra en vandig acetonitrilblanding. Cephalixin-zwitterionen fjernes fra reaktionsblandingen på konventionel måde, vaskes med acetonitril, tørres og fremstilles dernæst i en farmaceutisk blanding til anvendelse i den antibiotiske terapi til bekæmpelse af forskellige infektionssygdomme.

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer forbedringer ved processen til fremstilling af cephalixin, og disse forbedringer muliggør, at man kan adskille og uafhængigt optimere acyleringstrinnet og trinnet, hvori estergruppen fjernes. Den foreliggende fremgangsmåde frembringer et cephalixinprodukt, der udmærker sig derved, at det er fri for zink, phenylglycin og 7-ADCA i de tidligere mellemproduktstadier. At man er fri for urenheder er fordelagtigt, da udbyttet og pålideligheden af den endelige vandige krystallisering af cephalixinhydrat er forbedret. Tilmed tilvejebringer procesforbedringerne en mere fuldstændig udvinding af cephalixin, idet udbyttet fra DMF er af størrelsesordenen 95 - 98 % pr. genudfældning.

Følgende eksempler illustrerer nærmere den foreliggende opfindelse:

Eksempel 1

Spaltning af p-nitrobenzylester

En blanding af 26,0 g p-toluensulfonatsalt af cephalaxinesteren p-nitrobenzyl-3-methyl-7-(D- α -amino- α -phenylacetamido)- Δ^3 -cephem-4-carboxylat, 200 ml DMF og 20,0 ml koncentreret saltsyre omrørtes og holdtes på 5° C med ekstern afkøling, medens der portionsvis tilsattes 10,4 g pulverformig zink i løbet af en halv time. Blandingen omrørtes dernæst i 1 time uden yderligere køling og blev holdt ved stuetemperatur i adskillige timer. Efter filtrering blev cephalaxin-råstoffet i filtratet udfældet ved gradvis justering af pH i blandingen til 6,5 med triethylamin. Det farveløse krystallinske produkt, et bis-(dimethylformamid)-kompleks af cephalaxin, indsamledes, vaskedes med DMF og dernæst med ethylacetat og tørredes. Produktet vejede 16,5 g og udviste følgende analyser:

Cephalaxin (base) indhold, UV (264 m μ)	72,2 %
Diazoterbart nitrogen (optisk densitetsmetode)	ca. 2000 ppm
Zink	30 ppm
Phenylglycin	0,01 %
7-ADCA	0,13 %

Rensning af cephalaxin-bis(DMF)-kompleks i DMF

16,0 g cephalaxin-2(DMF)-kompleks fremstillet som ovenfor opløstes i 160 ml af en blanding af 95% DMF og 5% vand ved at indstille pH til ca. 2 med koncentreret saltsyre. Den lysegule opløsning filtreredes, og filtratet behandledes med triethylamin til en pH-værdi på 6,5 for at udfælde cephalaxin-bis(DMF)komplekset. Dette produkt opsamledes, vaskedes med DMF og ethylacetat og tørredes. Det farveløse, krystallinske produkt havde et smeltepunkt på 183 - 186° C, og vejede 15,7 g og havde et karakteristisk røntgendiffraktionsmønster og udviste endvidere følgende analyser:

Cephalexin (base), UV (264 m μ)	72,0 %
Diazoterbart aminonitrogen	ca. 150 ppm
Zink	Ikke detekterbar
Phenylglycin	Ikke detekterbar
7-ADCA	Ikke detekterbar

Endnu en DMF-opløsning med syre efterfulgt af udfældning af cephaloxinkomplekset med triethylamin formindskede indholdet af diazoterbart nitrogen i produktet til mindre end 50 ppm.

Eksempel 2

I en 285 liter reaktionsbeholder anbragtes 108 liter N,N-dimethylformamid (DMF), og der afkøledes til $+10^{\circ}$ C. Dernæst tilsattes halvdelen af en portion på 7,7 liter saltsyre p.a., og 10 kg p-toluensulfonatsalt af p-nitrobenzylesteren af cephaloxin. Dernæst tilsattes anden halvdel af portionen på 7,7 liter saltsyre. Til denne blanding sættes 4,08 kg zinkstøv i løbet af 40 minutter, medens blandingen afkøledes til under 12° C. Dernæst tilsattes i løbet af 30 minutter 10,8 liter saltsyre, og blandingen omrørtes natten over ved $+20^{\circ}$ C. Blandingen filtreredes, og ca. 800 gram remanens og afsat zinkstøv opsamledes på en filterhjælp (Hyflo pad) i en Büchner-tragt. Det opsamlede materiale var for størstedelens vedkommende en gul remanens og mindre end 20 g zinkstøv. Det filtrerede materiale på Büchner-tragten vaskedes med 4 liter DMF. Filtratet, der indeholdt produktet, behandlede med triethylamin til en pH-værdi på 6,9 til udfældning af cephaloxin-bis(N,N-dimethylformamid). Det udfældede produkt filtreredes på en Büchner-tragt og vaskedes med tre gange 15 liter DMF efterfulgt af to gange 14 liter ethylacetat. Det vaskede produkt tørredes ved 32° C. Der opnåedes 5,05 kg af cephaloxinkomplekset. Den teoretiske vægt for det rene cephaloxin baseret på vægten af udgangsmateriale var 4,695 kg. Udbyttet var 77,5%. En UV-analyse ved 264 m μ viste, at cephaloxinindholdet var 72%. Indholdet af diazoterbart nitrogen var ca. 2.000 ppm. 7-ADCA-indholdet var 0,07 vægtprocent. Produktet havde en grå farve.

Eksempel 3

Fremgangsmåden i eksempel 2 blev gentaget med 14,6 kg p-toluen-sulfonatsalt af p-nitrobenzylesteren af cephalixin, idet dog blandingen afkøledes til $+5^{\circ}$ C, og zinkstøvet dryssedes i reaktionsblandingens løbet af 35 minutter. Temperaturen blev holdt under 12° C. Der anvendtes 5,34 kg zink. Efter tilsætning af 14,13 liter saltsyre opvarmedes til 22° C, og blandingen omrørtes natten over. Den næste dag filtreredes blandingen. Remanensen opsamledes og vaskedes med DMF (4 liter). pH i filtratet indstilledes til 5,2, og der tilsattes 2 g af cephalexinkomplekset som podet krystal. Blandingens omrørtes i 30 minutter. Når de udfældede cephalexinkrystaller var af god, filtrerbar størrelse, indstilledes pH i opslæmningen til 6,0, og blandingen omrørtes i 15 minutter. pH indstilledes til 6,9, og blandingen omrørtes i 15 minutter og filtreredes dernæst. Filtringstiden var 45 minutter. Den vedhængende væske udludedes med tre gange 15 liter DMF og 2 gange 15 liter ethylacetat. Det krystallinske cephalixinprodukt tørredes og vejede 7,568 kg. Produktet havde en hvid farve. Cephalixinindholdet var 71,7% (UV-analyse). Den teoretiske vægt af cephalixin i dette kompleks var 6,3 kg. Det aktuelle udbytte var 86,1%. Indholdet af diazoterbart nitrogen var ca. 1.000 ppm, og 7-ADCA-indholdet var 0,14%.

Et andet forsøg udført på i det væsentlige den samme måde resulterede i et udbytte på 7,87 kg (80,6 %) af det hvide, krystallinske cephalixinprodukt, hvilket indeholdt 70 % cephalixin, ca. 2.000 ppm diazoterbart nitrogen og 0,09 % 7-ADCA.

Endnu et forsøg gav 7,38 kg (85 % udbytte) af det krystallinske cephalixin-bis-(DMF)-produkt, hvilket indeholdt 71,4 % cephalixin, ca. 1.500 ppm diazoterbart nitrogen og 0,09 % 7-ADCA.

Eksempel 4

En blanding af det rå cephalexinkompleks fra fire forsøg som beskrevet ovenfor, i alt 19,4 kg, opløstes i en blanding af 247 liter DMF og 28 liter destilleret vand. pH indstilledes til 2,0 med saltsyre. pH indstilledes til 6,9 med ammoniumhydroxid, og blandingen filtreredes på 2 Büchner-tragte og vaskedes med to portioner (18 liter pr. portion) 100% DMF. Efter prøveudtagning (0,901 kg) opløstes det tiloversblevne af det filtrerede, semi-rensede cephalexinkompleks i en blanding af 247 liter DMF og 28 liter vand ved hjælp af saltsyre. pH indstilledes dernæst til 6,9 med ammoniumhydroxid. Blandingen filtreredes til opsamling af produktet, cephalixin-bis(DMF)-komplekset, på en Büchner-tragt. Produktet vaskedes to gange med 15 liter DMF og to gange med ethylacetat (15 liter og 12 liter). Det oprensede cephalexinkompleks tørredes dernæst. Den totale vægt var 24,0 kg plus 115 gram for prøverne. Cephalixinindholdet var 70,0% målt ved UV-analyse. Indholdet af diazoterbart nitrogen var 300 ppm, og det aktuelle udbytte var 90%.

Eksempel 5

Til en 285 liter reaktor med en omrører sættes 92 liter destilleret vand, 6 kg saltsyre p.a. og 23 kg cephalixin-bis-(DMF)-kompleks. Denne blanding vaskedes med 11,5 liter ionbyttet vand og dernæst 0,640 kg natriumethylendiamintetraacetat i 5,5 liter destilleret vand, og der tilsættes 1,67 kg aktivt kul og omrøres i en time. Opløsningen filtreredes dernæst gennem et glasfilter på et ramme-filter og vaskedes med 15,3 liter destilleret vand. Filtratet og vaskevandet overførtes til et 285 liter destillationsapparat og opvarmedes til 55° C. pH indstilledes til 4,5 med triethylamin. Overskud af triethylamin opsamledes rundt om omrøreren.

Den overskydende triethylamin neutraliseredes med 3,0 liter saltsyre. Den maksimale pH-værdi var 5,6 i mindre end 5 minutter. Blandingen filtreredes på en Büchner-tragt, vaskedes med 5 liter vand og to gange 15 liter ionbyttet vand. Filtratet (180 liter) afkøledes og overførtes til en 285 liter destillationsbeholder.

Der tilsattes 90 liter acetonitril for at udfælde restindholdet. Begge produkter tørredes i luft ved 32°C til en konstant vægt. Der opnåedes 12,5 kg cephalixinmonohydrat (93% cephalixin) målt ved ultraviolet analyse (264 m μ). Indholdet af diazoterbart nitrogen var mindre end 50 ppm, og indholdet af DMF var 0,0602%. Vandindholdet blev bestemt ved hjælp af Karl Fischers analytiske metode og blev bestemt til 6,25%.

Den analytiske procedure til bestemmelse af diazoterbart amin i cephalixinprodukter er angivet nedenfor:

Diazoterbart amin i cephalixinhydrat

Kemisk betegnelse: 7-(D- α -amino- α -phenylacetamido)-3-methyl-3-cephem-4-carboxylsyre.

Alment navn: Cephalixin.

Analysemetode: Kolorimetrisk.

Anvendelse: Bestemmelse af diazoterbar amin.

I. Apparatur:

Beckman Model DU spektrofotometer eller andet egnet spektrofotometer.

II. Reagenser:

1. Saltsyre, 0,5 N
2. Natriumnitrat, 0,1% i H_2O
3. Ammonium-sulfamat, 0,5% i H_2O
4. N-(1-naphthyl)-ethylen-diamin-dihydrochlorid, 0,1% i H_2O

III. Procedure:

Afvej nøjagtigt ca. 100 mg cephalixin i en 50 ml Erlenmeyer-kolbe. Tilsæt 3,0 ml vand efterfulgt af 10,0 ml 0,5 normal HCl. Tilsæt 2,0 ml 0,1% natriumnitrit, bland og lad det henstå i 3 minutter. Tilsæt dernæst 2,0 ml 0,5% ammonium-sulfamat, omryst og lad det henstå i 3 minutter. Tilsæt 2,0

ml 0,1% N-(1-naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid. Bland godt og lad det henstå i 20 minutter. Bestem absorptionen af denne opløsning ved 550 m/ μ på et egnet spektrofotometer ved anvendelse af 1,0 cm kuvetter og vand i referencekuvetten.

Fodnote: Denne metode er en modifikation af den metode, der er beskrevet af A.C. Bratton og E.K. Marshall, Jr. i J. Biol. Chem., 128, (1939), pp. 537 - 550.

IV. Resultater:

$$\text{Abs.}_{550 \text{ m}/\mu} \times \frac{100}{\text{Vægt af prøve}} = \text{Abs. pr. 100 mg cephalixin}$$

V. Bemærkninger:

Detektionsgrænsen er 50 ppm.

P a t e n t k r a v:

1. Cephalalexinkompleks. til anvendelse som mellemprodukt til fremstilling af cephalalexin, k e n d e t e g n e t ved, at det er et kompleks af N,N-dimethylformamid eller N,N-dimethylacetamid og cephalalexin.

2. Kompleks ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at komplekset er cephalalexin-bis-(N,N-dimethylformamid).

3. Fremgangsmåde til fremstilling af komplekset ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man

- (a) blander N,N-dimethylformamid eller N,N-dimethylacetamid med en cephalalexinester eller et salt deraf indeholdende en fri primær aminogruppe eller en amino-blokerende gruppe, der kan fjernes med syre, og hvori estergruppen kan fjernes med et reduktionsmiddel i et surt medium;
- (b) behandler blandingen fra trin (a) med et reduktionsmiddel i et surt medium til fjernelse af estergruppen fra cephalalexin;
- (c) blander en basisk forbindelse med den fremkomne blanding fra trin (b) til dannelse af komplekset;
- (d) opløser komplekset af cephalalexinsyren og N,N-dimethylformamidet eller N,N-dimethylacetamidet i et medium af N,N-dimethylformamid, og
- (e) blander blandingen fra trin (d) med en basisk forbindelse for at øge pH indtil en værdi, ved hvilken komplekset af cephalalexin og N,N-dimethylformamid eller N,N-dimethylacetamid udfældes.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at

cephalexinesteren i trin (a) er p-nitrobenzyl- eller 2,2,2-trichlorethyl-3-methyl-7-[D- α -amino- α -phenylacetamido]- Δ^3 -cephem-4-carboxylat.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at cephalaxinesteren eller saltet deraf blandes med N,N-dimethylformamid.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at p-nitrobenzyl-3-methyl-7-[D- α -amino- α -phenylacetamido]- Δ^3 -cephem-4-carboxylat

(a) opløses i N,N-dimethylformamid,

(b) opløsningen fra trin (a) behandles med metallisk zink og en ikke oxiderende mineralsyre,

(c) en base tilsættes, indtil cephalaxin-bis-(N,N-dimethylformamid)-komplekset udfældes,

(d) komplekset af cephalaxinsyre og N,N-dimethylformamid opløses i et medium af N,N-dimethylformamid, og

(e) blandingen fra trin (d) blandes med en basisk forbindelse for at øge pH indtil en værdi, ved hvilken et kompleks af cephalaxinsyre og N,N-dimethylformamid udfældes.

Fremdragne publikationer:
