

固定化青霉素酰化酶 (PGA) 生产 7-ADCA 技术

7-氨基-3-去乙酰氧基头孢烷酸 (简称 7-ADCA) 是一种重要的头孢类抗菌素半合成的中间体, 在医药工业上用于合成头孢氯苯、头孢拉定、头孢克罗、头孢他美酯和头孢羟氨苄等药物, 这些药物都是市场用量较大的抗生素。由于这些药物的用量越来越大, 而国内 7-ADCA 的合成技术尚不十分成熟, 产量还很低, 在产量和质量上无法满足国内市场需求, 因此 7-ADCA 与 6-APA、7-ACA、GCLC、对羟基苯甘氨酸、头孢侧链、皂素、双烯等一起被国家经贸委列入急需支持发展的紧缺医药中间体之一, 从而成为医药工业 1999—2001 年的投资重点和结构调整的关键产品。

1 产品简介

7-ADCA 英文名称为 7-Amino-3-desacetoxyceph-alosporanic Acid, 产品为白色或微带黄色结晶性粉末。在水、乙醇或丙酮中不溶, 在强酸或强碱溶液中溶解。分子式 $C_8H_{10}N_2O_3S$ 。

2 用途

7-ADCA 是一种重要的头孢类抗菌素半合成中间体, 在医药合成中主要用于合成以下几种头孢菌素类药物:

2.1 合成头孢氨苄

头孢氨苄别名头孢力新、先锋霉素 IV、苯甘头孢菌素、头孢菌素 IV。CA 号: [15686-71-2], 分子式 $C_{16}H_{17}N_3O_4S \cdot H_2O$, 分子量 365.41。格拉克斯公司于 1967 年首先合成, 同年由礼来公司首先投入工业化生产。由 7-ADCA 与苯甘氨酸缩合而得。

头孢氨苄用途广泛, 对金黄色葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌、克雷白氏菌、肠杆菌及变形杆菌等引起的感染均有抗菌作用, 如呼吸系统、尿路及外科手术等引起的感染。在口服头孢菌素类抗生素中, 头孢氨苄在临床上应用最广。

2.2 合成头孢拉定

头孢拉定别名头孢雷定、先锋霉素 VI、环己烯胺头孢菌素、头孢环己烯。CA 号 [38821-53-3], 分子式 $C_{16}H_{19}N_3O_4S$, 分子量 349.41。由苯甘氨酸经还原、烷基化、氯化后再与 7-ADCA 缩合而得。

施宝公司在 1971 年合成头孢拉定, 它同头孢氨苄的抗菌活性和药代动力学性质相同, 头孢拉定适应于葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌、克雷白氏菌和变形杆菌等引起的呼吸系统感染和尿路感染。

2.3 合成羟氨苄头孢菌素

羟氨苄头孢菌素别名头孢羟氨苄, CA 号 [66592-87-8], 分子量 381.41。由 7-ADCA 与对羟基苯甘氨酸缩合而得。

羟氨苄头孢菌素由 Bristol-Myer 公司于 1976 年发现, 它的结构同头孢氨苄基本相似, 仅在 7 位侧键的苯环上的对位增加一个羟基。抗菌谱和头孢氨苄基本一致, 但其活性比头孢氨苄强 4-6 倍, 且在血浆中的半衰期比头孢氨苄长 2 倍。

2.4 合成头孢他美酯

英文名称 Cefetanet Pivoxil, CA 号 [65243-33-6], 分子式 $C_{20}H_{25}O_7S_2$, 分子量 511.17。由 7-ADCA 4 位羟基与三甲基乙酸氧甲基结合而成的酯。

它是一种第三代口服头孢菌素, 是由日本武田公司和罗氏公司 (R015-8075) 共同研制开发, 国外专利号: DE2715385。1992 年在墨西哥首次上市, 1996 年列入日本抗生物物质医药品基准。

该药品对变形菌、克雷伯菌、普罗威登斯菌和小肠结肠炎耶尔森菌有明显活性, 对肺炎链球菌、酿脓链球菌、无乳链球菌有高度活性; 本品不仅对流感嗜血菌和粘膜布兰汉球菌有活性, 而且对产生 β -内酰胺酶的菌株仍具有杀菌作用, 并对苍白密螺旋体有效, 但对厌氧菌很少有活性。本品口服后在胃肠道内酯酶作用下水解, 生成有抗菌活性的游离酸头孢他美而发挥作用。本品在临床上用于治疗呼吸道感染 (咽炎、扁桃体炎、支气管炎、肺炎)、泌尿系统感染 (急性膀胱炎、淋球菌性尿道炎、急性肾盂肾炎)。

目前该产品已经在我国开发成功, 最近将投入工业化生产。

3 国内外生产情况

7-ADCA 主要用于生产头孢菌素, 1948 年 Brotzu 从撒丁海岸的下水口附近采取的泥土中首次分离出头孢菌素产生菌, 到 1970 年代中期先锋 IV 即已成为国内外使用量最大的半合成抗菌素之一。竞争激烈的头孢菌素的市场目前已形成了 DSM-GB、Antibioticos、Biochemie 等欧美公司和中国、印度、韩国等亚洲公司并存的工业格局。亚洲公司具有劳动力低廉的优势, 生产和出口大量原料药, 而 DSM-CB 等的崛起依靠的则是其高新技术。作为重要的头孢菌素中间体的 7-ADCA, 这几年的产量增长很快, 据统计 1996 年全世界的总产量为 5460t, 2000 年已达到 6250t, 预计 2005 年世界 7-ADCA 总产量将达到 6890t。荷兰化学公司 DSM 是世界上 7-ADCA 产能力最大的企业, 1999 年底该公司花费大约 1.32 亿美元在代尔夫特建立了一座世界级工厂, 该厂已于 2000 年下半年投入生产。DSM 目前在代尔夫特、葡萄牙和印度设有工厂。荷兰 DSM 公司采用的是一种新的发酵法生产工艺, 每年生产 800t 7-ADCA。

我国的头孢菌素生产起步较晚，由于受中间体合成技术的限制，我国长期以来一直依靠进口 7-ADCA 或者进口原料药未满足国内市场需求，我国从“六五”开始立项研制该产品，但因技术原因未能形成工业化生产，仍然依赖进口。

在多年科研的基础上，1990 年代中期哈尔滨制药总厂投资建设了一条生产线，成为当时中国唯一一家具有 6-APA、7-ACA、7-ADCA 三大抗生素母核生产能力的制药企业，现在该公司 7-AnA 生产能力已达到 22 t/a。浙江永宁制药厂也建设了一条 50 t/a 生产线。“七五”以来，为改变我国半合成抗生素依赖进口的局面，华药积极致力于半合成抗菌素的研究和产品开发。经过 10 年多的不懈努力，到 1999 年初开发出了加工半合成抗菌素的中间体 6-APA、7-ADCA 等，而且还研制开发出了半合成青霉素类、半合成头孢菌素类多种半合成抗菌素原料药及制剂，华北制药信达有限公司于 1999 年 1 月 18 日全面投产，使华药的半合成抗生素总生产能力达到 1200t/a，成为我国目前最大、也是亚洲最大的半合成抗生素生产基地，其生产规模及技术水平都达到世界先进水平，现在华北制药集团的 7-ADCA 生产能力达到 225t/a。“九五”期间鲁抗集团投入技改、基建资金达 12.5 亿元，贯通了青霉素→6-APA→半合青→制剂；青霉素→7-ADCA→半合成头孢→制剂及头孢菌素 C→7-ACA→头孢唑啉酸→头孢唑啉钠(头孢哌酮)→制剂等三条完整的生产链，1999 年底鲁抗医药 140 t/a 7-ADCA 工程建成投产，成为国内 7-AnA 生产能力较大的厂家之一。

四川制药集团也有多年的 7-ADCA 生产历史，该集团在传统生产工艺的基础上也进行了酶法改造，现已形成了 220 t/a 的生产能力。中外合资水进精细化工有限公司从 1999 年底开始投资建设的一条 200 t/a 生产线也于近期投入运行。另外浙江医药股份有限公司新昌制药厂和上海医药集团公司也在进行招商引资拟各建设一条 200t/a 生产线。综上所述国内 7-ADCA 的总生产能力已达到 1000 t/a 左右。

4 国内外市场情况

在医药工业上，7-ADCA 主要用于合成头孢菌素，头孢菌素又称先锋霉素，是一类广谱半合成抗生素，从 1964 年礼来公司上市第一个头孢菌素头孢噻以来，到目前为止，已上市品种达 60 余种，产量占世界抗生素产量的 60%以上。头孢菌素与青霉素相比具有抗菌谱较广、耐青霉素酶、疗效高、毒性低、过敏反应少等优点，在抗感染治疗中占有十分重要的地位。头孢菌素已从第一代发展到第四代，其抗菌范围和抗菌活性也不断扩大和增强。

世界范围内，1997 年青霉素原料产量达 37kt，其中包括青霉素 G24kt 和青霉素 V13kt。目前世界青霉素年需求量为 38kt，但直接作为注射剂使用的青霉素 G 和作为口服剂使用的青霉素 V 仅占全部青霉素产品的 20%，除了另外 3%—5% 作为兽药或饲料添加剂使用外，大部分青霉素是作为制备 6-APA、7-ADCA 或 GCLE（氯亚甲基头孢烯母核）的原料，通过这些母核中间体转化成高附加值产品推向市场。据估计，今年在世界范围内对 7-ADCA 的需求约为 6kt 到 200 年将达到 7kt。到 2005 年，世界基本药物中仅羧苄青霉素、氢苄青霉素和头孢氨苄

三个品种的需求量将达 17.8kt (其中: 羟氨苄为 11kt、氨苄 500t、头孢氨苄为 1.8kt), 这三种药物就占抗感染药物 78%, 用于生产这些半合成产品所需消耗的青霉素约占全部产量的 3/4, 其中有 70% 以上被用来合成 7-ADCA。

我国目前经国家批准临床应用的头孢类抗生素制剂品种有 22 种, 其中只有 8 种我国可以生产原料药, 但生产规模远不能满足制剂的需求, 市场缺口较大, 第三代头孢菌素仍需进口原料药分装制剂或直接进口制剂满足临床需求。头孢菌素类产品国内市场销势较为强劲, 与老产品青霉素市场需求相比, 国内头孢菌素类市况较好。到 2000 年底, 头孢菌素年销售额突破 3 亿美元的品种有头孢曲松、头孢唑肟、头孢呋辛、头孢替尼和头孢拉定。从 1999 年全国十大城市典型医院的用药金额看, 头孢菌素仍占抗感染药首位, 年销售额为 98086 万元, 较 1996 年增长 24.9%, 占抗生素用药额的 69%, 在用药排序前 50 位的药品中, 头孢菌素有 17 种。国内头孢菌素市场, 从品种上看多为进口药品所占领, 国产品种在目前市场上占有一定份额的只有头孢氨苄、头孢唑啉、头孢拉定等少数品种。1999 年国产头孢菌素只有 9 个品种, 产量约 433t。占同期全球总产量 13kt 的 3.3%。目前国内常用头孢菌素品种多达 19 种, 1997 年进口 10 种, 价值约 12159.4 万美元, 总量达 428.9t。因此, 无论从品种数最上看还是从总量之比看, 国产头孢菌素均远落后于国际水平, 尚有很大的发展空间。

头孢类抗生素又可分为以 7-ADCA 为母核和以 7-ACA 为母核的两大系列。其中 7-ADCA 系为青霉素的深加工产品, 其生产流程为: 青霉素工业盐 → 7ADCA → 半合成头孢菌素, 主要产品有: 孢氨苄、头孢羟氨苄、头孢拉定、头孢克罗、头孢他美酯等十几个品种。在我国 7-ADCA 主要用于合成头孢氨苄、头孢拉定和头孢羟氨苄等药物, 由于以 7-ADCA 合成的这几种药品具有抗菌谱广, 毒副作用小, 无过敏反应及可以口服等特点, 其应用甚广。在口服头孢菌素类抗生素中, 头孢氨苄在临床上应用最广, 头孢拉定的抗菌作用同头孢氨苄于大体相同, 头孢羟氨苄比头孢氨苄稍强。据最新统计显示, 在全国十大城市医院用药中, 头孢氨苄的使用量排在头孢类抗生素用药的前三名。我国头孢氨苄原料药生产近年增长较快, 从 1996 年的 50t 猛增到 1999 年的 204t。国内主要厂家为广州白云山制药厂、天津史克、华北制药集团、山东新华制药集团、东北制药厂、哈尔滨制药厂、上海第四制药厂、东制药厂、江西景明制药集团。我国近几年头孢拉定原料药生产一直快速增长, 1999 年生产 95t, 2000 年估计达到 200t 以上。生产头孢拉定的企业有山东新华制药集团、上海第四制药厂; 生产头孢羟氨苄的企业有山东新华制药集团、石家庄第一制药厂、上海第四制药厂、广东制药厂。我国头孢菌研究开发起步晚, 再加上种种原因, 前几年生产的头孢菌素技术水平远远低于国外, 近年来由于多家厂引进技术努力开发, 所以水平大大提高。头孢氨苄和头孢唑啉收得率分别提高到近年的 38% 和 56%; 头孢拉定和头孢羟氨苄收率也较高。上述几个品种的收率接近国际水平, 但有的品种则较低, 个别品种与国际水平相比差距较大, 有待继续提高。随着国内头孢菌素合成技术日益成熟, 国内将由进口原药转为自己生产原药, 这样对中间体的需求越来越大。估计全年 7-ADCA 的总需求量在 1kt 左右, 而国内 7-ADCA 的合成技术尚不十分成熟, 我国仅有河北、广东、浙江、山东、四川、黑龙江几个厂家生产 7-ADCA, 总生产能力近 1kt/a, 实际产量约 400t/a, 产量还很低, 产量和质量都无法满足国内市场的需求, 一直依靠进口来解决, 现在国内主要进口荷兰 DSM、台湾骏洋化学

公司、印度和韩国的产品，据海关提供的数字，2001年1—3月我国共进口7-ADCA 90109kg，金额6568657美元；出口150000kg，金额98935美元。进口头孢氨苄及其盐55600kg，金额3261036美元，没有出口。从以上统计资料看进口的数量还比较多。因此，7-ADCA的生产和应用存在很大的发展空间。

5 国内生产工艺技术进展情况

7-AnA可以由头孢菌素C直接在高压下催化氢解制备，然而收率较低，且在还原时需要大量催化剂，没有工业化价值。

Morin和他的同事采用青霉素G(V)为起始原料制取7-ADCA，这是传统的7-ADCA的合成路线，即青霉素钾盐经氧化、硅酯化、扩环、裂解而得到7-ADCA。自1970年以青霉素为原料经过氧化扩环酶解制7-ADCA获得成功以来，国外已经有数家制药公司相继投产，如韩国MIWIN公司，其总质量收率为39.5%；美国LILLY公司总质量收率为46%；西班牙GEMA公司总摩尔收率为72.6%，为青霉素向头孢菌素的化学转化起到了十分重要的推动作用。最有意义的比较参数是青霉素的投入与7-ADCA产出的比率，生产1kg的7-ADCA需要青霉素的量应不超过2.6kg。较好的情况是在不增加成本的情况下达到每公斤7-ADCA需要投入2.4kg的青霉素。荷兰DSM-Gb公司研究开发了生产7-ADCA的新工艺，即直接发酵头孢菌素前体，然后用酶法裂解成7-ADCA。这种技术在今后15年中将为该公司所独有。

第一步反应青霉素氧化制备青霉素亚砷的方法大致有两种：方法一是先将青霉素3位上的羧基与其它试剂作用形成羧酸酯（或者酞）加以保护，再氧化制得青霉素亚砷羧酸酯（或酞），青霉素亚砷羧酸酯（或酞）直接扩环完成向头孢菌素母核的转化后，再用适当的方法去保护，使羧基游离出来；方法二是在一定催化剂作用下，将青霉素直接氧化成青霉素亚砷，国内清华大学也进行了这方面的研究。

第二步反应是青霉素亚砷硅酯扩环制备7-苯乙酰胺基去乙酰氧基头孢烷酸（简称头孢C酸），在这步反应中催化扩环是整个工艺过程的关键，其收率的高低主要取决于扩环催化剂的活性大小。我国的科技人员投入了大量的精力进行研究，并取得了一定的成果，河北科技大学化学与制药工程系等单位进行了头孢C酸制备的研究，针对合成7-ADCA过程中青霉素亚砷硅酯扩环制备头孢C酸收率低的问题，开发了一种新型的高效扩环剂BrAc-4-甲基吡啶（简称MAB-II），该催化剂的开发成功使扩环反应制取头孢G酸的收率由过去的80%以下提高到93%以上，大大提高了传统工艺生产7-ADCA的收率，降低了7-ADCA的合成成本。

在第三步反应头孢G酸裂解制备7-ADCA的方法，主要有两类。方法一是化学裂解法，该法是以头孢酸酯用PCl₃与甲醇反应，先生成易水解的亚胺醚，再水解生成7-ADCA。反应式如下：

本反应步骤多，要求温度 $-15-20^{\circ}\text{C}$ ，成本高，同时要治理三废，不适于工业化生产。

另一类是酶解法，该法是用固定化青霉素酰化酶来裂解直接生产 7-AnA，该法操作简单、收率高、产品质量好，是国外公司普遍采用的工艺。但我国酶法工艺与世界相比还有很大的差距，近几年在酶催化裂解合成 7-ADCA 方面我国的科研机构也做了大量的研究开发工作，1990 年代初，国家医药管理局上海医药工业研究院进行了酶法替代化学法裂解重排的工艺研究，开发了新的合成路线。该工艺具有以下优点：①通过酸化酶菌种的筛选和紫外光诱变育种获得大肠杆菌 UR160 菌，产菌能力稳定；②研究了发酵条件，在原有培养基中加入 0.5% 酵母膏，使 UR160 产菌能力提高了 50%，菌体得量增加一倍；③研究了菌体固定化方法、固定化菌体的有关性质，优化了裂解重排头孢 G 酸为 7-ADCA 的最优化条件。该工艺的改进使 7-ADCA 的合成成本大幅度降低。另据报道近期河北科技大学史兰香等人在这方面也取得了可喜的进步，他们用头孢 C 酸在固定化青霉素酰化酶催化下裂解制备 7-ADCA。其方法是：在硼酸缓冲溶液中，以固定化青霉素酰化酶催化裂解头孢 G 酸制备 7-ADCA。最优反应条件为温度 $28-30^{\circ}\text{C}$ ； $\text{pH}7.8-8.0$ ；IPA-750 用量每 10g 头孢 G 酸 11.6-12g。使用过程中 IPA-750 虽裂解时间较长，但价格低，用以替代 pGA-450 在经济上是合算的。产品收率达 93%。

华北制药倍达公司从 1997 年开始研究 7-ADCA 的工业化生产，该项目被列为国家“九五”重点攻关项目和国家级双加项目，他们开发的化学合成-酶法生产 7-ADCA 的工艺路线于 2000 年 12 月通过了省级鉴定。专家们认为：倍达公司开发的化学合成-酶法生产 7-ADCA 工艺先进，制造成本低，生产原料实现了国产化，产品质量和技术指标均达到国际先进水平，填补了国内空白。采用新法取代传统的化学法生产工艺，特别是采用经遗传修饰的产黄青霉发酵和一酶催化工序比原工艺有了很大的进步。发酵法与化学法相比，除可节能 1/3 外，还有不必使用甲苯和其他有机溶剂的优点。

在头孢 C 酸酶活制备 7-ADCA 的催化用酶方面我国也取得了很大的进步，据报道中国科学院于 1999 年底借助实验室在固定化酶制剂上 30 年的经验和技術积累，开发成功了以壳聚糖为基质的高活力固定化 PGA，其固定化酶活力是市场上所用的进口固定化载体的 2 倍以上。这种低价高效的醇和高性能载体为我国酶法裂解生产 7-ADCA 奠定了良好的基础。

1999 年前后清华大学也进行了 7-ADCA 合成工艺的研究，开发成功了新的工艺路线。新工艺仍然采用青霉素钾为原料，经过硫氧化、扩环、酶解而得。

该工艺路线以青霉素钾盐计，头孢 C 收率 75%；以头孢 G 计，7-ADCA 收率 $\geq 92\%$ 。即以青霉素钾盐计，7-ADCA 收率 $\geq 69\%$ （以上头孢 G 和 7-ADCA 收率均为摩尔收率），这些指标远远超过了现有工艺技术的水平。生产过程中的中间体头孢 G 含量 $\geq 98\%$ ；最终产品 7-ADCA 含量 $\geq 95\%$ ，水分 $\leq 1.0\%$ ，完全可以满足进一步合成抗菌药物的要求。采用清华大学开发的新工艺合成 7-ADCA，建设一条 100 t/a 生产线，总投资约 430 万元，其中设备投资约 360 万元。按目前的工业原材料价格计，1t 7-ADCA 的原材料成本将不会超过 72 万元，综合工

业生产成本将不会超过 77 万元。而且该合成过程中无高压、高温反应条件，不使用强腐蚀性试剂，操作安全。