

利福平合成工艺研究

丁毓¹, 吴艳阳^{1*}, 张相洋², 朱家文¹, 陈葵¹, 武斌¹, 纪利俊¹

(1. 华东理工大学化学工程研究所, 上海 200237;

2. 华东理工大学化学工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 为了提高利福平的产品质量, 对目前国内普遍使用的噁嗪工艺进行了研究与优化。直接以发酵液氧化萃取制得的利福霉素 S 为原料进行环合反应和缩合反应合成利福平, 与以往的利福霉素 S 钠盐为原料相比, 无需利福霉素 S 钠盐的结晶、分离、干燥及酸化过程, 生产工艺更为简单。考察了环合反应温度和时间、缩合反应温度和时间、原料配比及相关的催化剂用量对利福平收率和纯度的影响。得到较优工艺条件为: 环合反应温度为 55℃, 环合反应时间为 1.5 h, $V(N, N$ -二羟甲基叔丁胺): V (冰醋酸): m (抗坏血酸): m (利福霉素 S) = 0.278:0.014:0.014:1.000, 缩合反应温度为 55℃, 缩合反应时间为 2 h, $V(1$ -甲基-4-氨基哌嗪): m (利福霉素 S) = 0.463:1.000, 此时, 利福平粗品的收率可达 86.56%, 纯度为 92.69%。

关键词: 利福霉素 S; 环合反应; 缩合反应; 利福平; 收率

中图分类号: TQ465.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2018)10-0123-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2018.10.027

Study on synthesis of rifampicin

DING Yu¹, WU Yan-yang^{1*}, ZHANG Xiang-yang², ZHU Jia-wen¹, CHEN Kui¹,
WU Bin¹, JI Li-jun¹

(1. Chemical Engineering Research Center, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China; 2. State Key Laboratory of Chemical Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Rifampicin is an important drug against tuberculosis, with large market demand. To improve the quality of rifampicin, the rifampicin synthesis process via oxazine, which is widely used in China, is studied and optimized. Rifampicin can be synthesized through cyclization and condensation reactions of rifamycin S that is prepared directly by oxidation and extraction of zymotic fluid, which is simpler without the crystallization, separation, drying and acidification for rifamycin S sodium salt compared with the traditional process that uses rifamycin S sodium salt as raw material. The effects of temperature and time of cyclization, temperature and time of condensation, ratios among raw materials and dosage of catalyst on the yield rate and purity of rifampicin product are investigated. The appropriate conditions obtained are listed as follows: 55℃ and 1.5 h for the cyclization reaction, $V(N, N$ -dihydroxymethyl tertbutylamine): V (glacial acetic acid): m (ascorbate acid): m (rifamycin S) = 0.278:0.014:0.014:1.000, 55℃ and 2 h for the condensation reaction, $V(1$ -methyl-4-aminopiperazine): m (rifamycin S) = 0.463:1.000. Under these conditions, the yield rate and purity of crude rifampicin product can reach 86.56% and 92.69%, respectively.

Key words: rifamycin S; cyclization reaction; condensation reaction; rifampicin; yield rate

利福平是一种广泛用于治疗麻风病和肺结核的药物, 也可用来抵抗流感嗜血杆菌、葡萄球菌以及艾滋病相关性鸟型分枝杆菌等病原体^[1-3]。利福平是防治结核病的重要药物, 是目前市场需求量最大的药品之一。利福平的制备方法有多种, 国内和国外生产工艺均不同^[4-10]。目前, 利福平的生产以国内为主, 国内合成利福平主要采用噁嗪工艺, 原料利福霉素 S 钠盐经酸化生成利福霉素 S, 不对利福霉素 S 进行分离与纯化, 直接加入 N, N -二羟甲基叔丁胺与利福霉素 S, 在 N, N -二甲基甲酰胺中进行环合反应生成中间产物, 再加入 1-甲基-4-氨基哌嗪进行

缩合反应生成利福平。一方面生物合成所获得的利福霉素 SV 发酵液效价不高, 使所得利福霉素 S 钠的杂质质量分数较高, 目前工业品的杂质质量分数约为 85%, 与从发酵液直接氧化萃取制得的利福霉素 S 相比, 杂质质量分数较多; 另一方面以利福霉素 S 钠作为初始反应物, 比直接使用利福霉素 S 生产利福平多了一步酸化得到利福霉素 S 的过程。利福霉素 S 钠的纯度以及酸化反应的进行程度都会对目标产物利福平的收率和纯度造成影响。

笔者直接以发酵液氧化萃取制得的利福霉素 S 为原料, 经环合反应和缩合反应合成利福平, 与传统

收稿日期: 2018-01-31; 修回日期: 2018-08-17

基金项目: 上海浦江人才计划项目(16PJD019); 国家自然科学基金(21406071)

作者简介: 丁毓(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向为化工制药, Dingyu_work@163.com; 吴艳阳(1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为传质与分离, 通讯联系人, 021-64253914, wyywitty@ecust.edu.cn。

工艺相比,无需利福霉素 S 钠盐的结晶、分离和干燥以及浓硫酸酸化的过程。同时进行单因素变量实验,改进利福平的合成工艺,开发出更高效的利福平合成工艺,提高利福平产品的质量。

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

利福霉素 S、*N,N*-二羟甲基叔丁胺(DMB)、1-甲基-4-氨基哌嗪(MAP),均为工业级,同联集团沈阳抗生素厂生产;冰醋酸、甲醇、抗坏血酸、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、正丁醇,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司生产;利福平标准品,HPLC,国家食品药品检定研究院生产。

SPECORD 210 PLUS 紫外-可见分光光度计,德国耶拿分析仪器股份公司生产;SY-2000 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂生产;SHZ-D(Ⅲ)型循环水真空泵,上海晖创化学仪器有限公司生产;85-2 型恒温磁力搅拌器,上海司乐仪器有限公司生产;DC-3015 低温恒温槽,上海恒平科学仪器有限公司生产;DZF-6050 真空干燥箱,上海精宏实验设备有限公司生产;FA224 电子分析天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司生产;PHSJ-4F 实验室 pH 计,上海雷磁仪器有限公司生产。

1.2 利福平的合成

利福平的合成过程包括环合反应、浓缩、萃取、缩合反应和降温结晶等步骤。

环合反应:取一定量的利福霉素 S,置于 150 mL 的三口夹套瓶中,用 DMF 溶解,在搅拌状态下通过恒温水浴槽加热至恒定温度。然后加入适量 *N,N*-二羟甲基叔丁胺进行反应,一定时间后终止反应,得到利福霉素哌嗪反应液。

浓缩、萃取:用旋转蒸发器对利福霉素哌嗪反应液进行浓缩,蒸出一定量的 DMF,加入适量的正丁醇进行稀释,并转入分液漏斗,然后加入一定量的去离子水进行萃取,保温静置一段时间。

缩合反应:将水相和醇相分离,然后将醇相转移到 150 mL 的三口夹套瓶中,在搅拌状态下通过恒温水浴槽加热至恒定温度,加入适量 1-甲基-4-氨基哌嗪进行反应,一定时间后终止反应,得到利福平反应液。

降温结晶:调节利福平反应液的 pH,加入一定量的去离子水,在搅拌状态下降温结晶。随后关闭搅拌,静置 3 h,进行抽滤,得到利福平粗品,干燥,测定含量并计算收率。

1.3 分析方法

利用紫外及可见分光光度计对利福平进行检测分析。准确称取 40 mg 利福平并置于 50 mL 容量瓶中,加入 5 mL 甲醇助溶,待利福平完全溶解后,加入 pH 7.0 的缓冲溶液至刻度处。分别移取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 上述溶液置于 50 mL 容量瓶中,加入 pH 7.0 的缓冲溶液稀释至刻度处,摇匀,在 474 nm 处测定溶液的吸光度。利福平标准曲线如图 1 所示,方程为 $y = 0.018\ 31x - 0.013\ 4$, R^2 为 0.996 8。

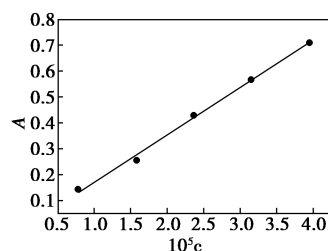


图 1 利福平标准曲线

2 结果与讨论

以利福平粗品的收率和纯度(质量分数)为指标,分别考察了环合反应温度和时间、缩合反应温度和时间、原料配比及相关的催化剂用量等因素的影响。

2.1 *N,N*-二羟甲基叔丁胺(DMB)用量的影响

在利福霉素 S(以下简称 S)质量为 7.5 g,冰醋酸用量为 0.2 mL,抗坏血酸质量为 0.2 g,反应温度为 50℃,反应时间为 2 h,MAP 用量为 3.3 mL,缩合反应温度为 50℃,缩合反应时间为 2 h 的条件下,DMB 用量对利福平粗品的收率和纯度的影响如图 2 所示。

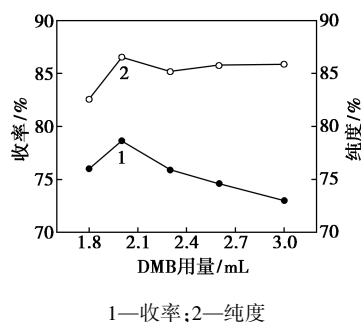


图 2 DMB 用量对利福平收率和纯度的影响

通过物料衡算, $V(\text{DMB}) : m(\text{S}) = 0.2\ \text{mL/g}$,为了使反应进行的更彻底,DMB 在实验中的实际加入量应适当过量。由图 2 可以看出,当 $V(\text{DMB}) : m(\text{S}) < 0.278\ \text{mL/g}$ 时,利福平的收率和粗品的纯度

都较低,反应进行不彻底;当 $V(\text{DMB}):m(\text{S})=0.278 \text{ mL/g}$ 时,利福平的收率最大,粗品纯度也比较高;而当 $V(\text{DMB}):m(\text{S})>0.278 \text{ mL/g}$ 时,利福平的收率降低,表明 DMB 的用量并不是越多越有利于反应的进行,过多的 DMB 会增大反应体系的酸碱度,引发较多的副反应,从而导致目标产物生成量减少,造成原料的浪费。因此,DMB 的用量不宜过多,最适宜用量为 $0.278 \text{ mL/g}(\text{S})$ 。

2.2 冰醋酸用量的影响

选择冰醋酸作为酸性介质来调节反应体系的 pH。在利福霉素 S 质量为 7.5 g , DMB 用量为 2 mL , 抗坏血酸质量为 0.2 g , 环合反应温度为 50°C , 环合反应时间为 2 h , MAP 用量为 3.3 mL , 缩合反应温度为 50°C , 缩合反应时间为 2 h 的条件下,考察冰醋酸用量对利福平粗品的收率和纯度的影响,结果如图 3 所示。

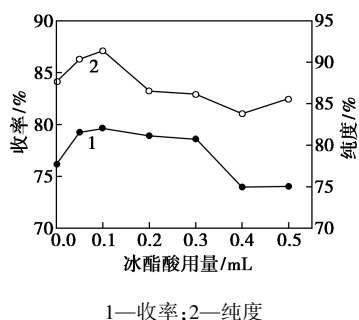


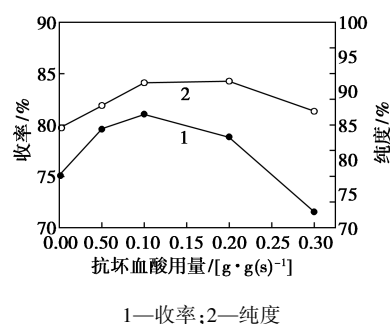
图3 冰醋酸用量对利福平收率和纯度的影响

由图 3 可以看出,随着冰醋酸用量的增加,利福平粗品的收率和纯度均呈现先增大后降低的趋势。

由环合反应的反应机理,酸性条件下,DMB 脱水生成不稳定的四元环结构,在被富集电子的烯键进攻后,开环形成稳定的六元环结构,然后经原子转移和脱水得到利福霉素咪嗪^[11]。因此,该反应需要在弱酸的环境下进行。由实验结果可知,少量酸可以促进反应的进行,但是,当冰醋酸用量过多时,由于反应物 DMB 自身呈碱性,过多的酸会反应掉一部分 DMB,造成原料的浪费,从而导致利福平粗品收率降低,不利于反应的进行。因此,冰醋酸的加入量应为 $0.014 \text{ mL/g}(\text{S})$ 。

2.3 抗坏血酸用量

在利福霉素 S 的质量为 7.5 g , DMB 用量为 2 mL , 冰醋酸用量为 0.1 mL , 反应温度为 50°C , 反应时间为 2 h , MAP 用量为 3.3 mL , 缩合反应温度为 50°C , 缩合反应时间为 2 h 的条件下,抗坏血酸用量对利福平粗品的收率和纯度的影响如图 4 所示。



1—收率;2—纯度

图4 抗坏血酸用量对利福平收率和纯度的影响

由图 4 可以看出,加入少量的抗坏血酸,利福平粗品的收率和纯度都得到了提高,随着抗坏血酸用量的继续增加,利福平的收率反而会有所降低。

通过前期的基础实验发现,环合反应加入醋酸后,反应速度加快,产品的收率和粗品质量分数都有所提高,但是第二步缩合反应在短时间内难以进行完全,甚至补加 MAP 也没有明显的效果。通过薄层层析发现,利福平主斑点上有明显的褐色醌式利福平斑点,说明缩合反应中有部分利福平被氧化。由于抗坏血酸是有效的抗氧化剂,实验中可以加入抗坏血酸防止利福平被氧化。因此,抗坏血酸的最适宜用量为 $0.014 \text{ g/g}(\text{S})$ 。

2.4 环合反应温度的影响

在利福霉素 S 的质量为 7.5 g , DMB 用量为 2 mL , 冰醋酸用量为 0.1 mL , 抗坏血酸质量为 0.1 g , 反应时间为 2 h , MAP 用量为 3.3 mL , 缩合反应温度为 50°C , 缩合反应时间为 2 h 的条件下,环合反应温度对利福平粗品的收率和纯度的影响如表 1 所示。

表1 环合反应温度对利福平收率和纯度的影响

温度/ $^\circ\text{C}$	50	55	60	65
$y/\%$	81.02	83.53	81.21	79.53
$w/\%$	91.13	91.59	90.84	87.67

由表 1 可以看出,随着反应温度的升高,利福平粗品的收率和纯度均增大,当反应温度为 55°C 时,利福平粗品的收率和纯度均达到最大值,然后随着温度的升高利福平粗品的收率和纯度均有所降低。这是由于过高的温度导致中间产物发生了分解。

鉴于环合反应的产物(利福霉素咪嗪)热稳定性较差,为此对其热稳定性进行了分析,结果如表 2 所示。

表2 不同温度下利福霉素咪嗪的吸光度

温度/ $^\circ\text{C}$	55	60	65	70	75
A	0.229	0.226	0.224	0.221	0.216

由表 2 可以看出,利福霉素噻嗪的吸光度随着温度的升高而降低,说明温度越高,中间产物利福霉素噻嗪稳定性越差,不利于后续反应的进行,从而造成原料的浪费。因此,环合反应较适宜的温度为 55℃。

2.5 环合反应时间的影响

在利福霉素 S 质量为 7.5 g,DMB 用量 2 mL,冰醋酸用量为 0.1 mL,抗坏血酸质量为 0.1 g,反应温度为 55℃,MAP 用量为 3.3 mL,缩合反应温度为 50℃,缩合反应时间为 2 h 的条件下,环合反应时间对利福平粗品的收率和纯度的影响如表 3 所示。

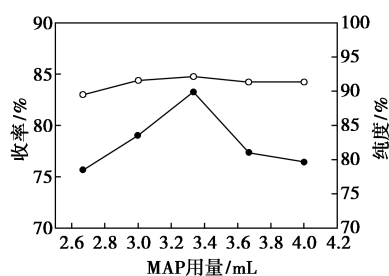
表 3 环合反应时间对利福平收率和纯度的影响

时间/h	1.0	1.5	2.0
y/%	80.90	83.56	83.59
w/%	91.37	92.12	91.70

由表 3 可以看出,随着反应时间的加长,反应进行的越完全。当反应进行 1.5 h 后,利福平粗品的收率和纯度随着反应时间的增加基本没有太大的变化。过长的反应时间不但没有使利福平收率增大,反而会降低生产效率。因此环合反应的最佳时间为 1.5 h。

2.6 1-甲基-4-氨基吡嗪 (MAP) 用量的影响

在利福霉素 S 的质量为 7.5 g,DMB 用量为 2 mL,冰醋酸的用量为 0.1 mL,抗坏血酸的质量为 0.1 g,反应温度为 55℃,环合反应时间为 1.5 h,缩合反应温度为 50℃,缩合反应时间为 2 h 的条件下,MAP 的用量对利福平粗品的收率和纯度的影响如图 5 所示。



1—收率;2—纯度

图 5 MAP 用量对利福平收率和纯度的影响

由图 5 可以看出,随着 MAP 用量的增加,利福平粗品的收率和纯度都有所提高,当 MAP 用量为 0.463 mL/g(S),利福平粗品的收率和纯度最大,然后随着 MAP 用量的增加,利福平的收率明显降低。表明在缩合反应中,由于反应物 MAP 本身呈碱性,其加入量会影响反应体系的 pH,随着 MAP 用量的

增加,体系的 pH 也会随之变大,使得副反应加剧,容易生成醌式衍生物,导致利福平粗品的收率和纯度降低。因此,MAP 用量应为 0.463 mL/g(S)。

2.7 缩合反应温度的影响

在利福霉素 S 质量为 7.5 g,DMB 用量为 2 mL,冰醋酸用量为 0.1 mL,抗坏血酸质量为 0.1 g,反应温度为 55℃,环合反应时间为 1.5 h,MAP 用量为 3.3 mL,缩合反应时间为 2 h 的条件下,缩合反应温度对利福平粗品的收率和纯度的影响如表 4 所示。

表 4 缩合反应温度对利福平收率和纯度的影响

温度/℃	50	55	60	65
y/%	83.25	86.56	83.50	83.03
w/%	92.12	92.69	92.25	92.31

由表 4 可以看出,随着反应温度的升高,利福平粗品的收率和纯度均增加,但温度超过 55℃ 后,利福平的收率稍有下降,利福平粗品的纯度随温度升高并没有明显的变化。所以缩合反应温度以 55℃ 为宜。

2.8 缩合反应时间的影响

在利福霉素 S 质量为 7.5 g,DMB 用量为 2 mL,冰醋酸用量为 0.1 mL,抗坏血酸质量为 0.1 g,反应温度为 55℃,环合反应时间为 1.5 h,MAP 用量为 3.3 mL,缩合反应温度为 55℃ 的条件下,缩合反应时间对利福平粗品的收率和纯度的影响如表 5 所示。

表 5 缩合反应时间对利福平收率和纯度的影响

时间/h	1.0	1.5	2.0	2.5
y/%	82.97	84.37	86.56	83.89
w/%	91.35	92.65	92.69	91.89

由表 5 可以看出,随着反应时间的增加,利福平粗品的收率和纯度都有所提高,但当反应时间超过 2.0 h 后,利福平的收率和粗品质量分数都稍有下降,所以缩合反应时间以 2.0 h 为宜。

3 结论

直接以发酵液氧化萃取制得的利福霉素 S 为原料合成利福平,与传统的利福平生产过程相比,无需利福霉素 S 钠盐的结晶、分离、干燥以及浓硫酸酸化的过程。对利福平制备过程的工艺进行考察和优化,利福霉素 S 经环合反应和缩合反应生成利福平的较优工艺条件为:环合反应温度为 55℃,环合反应时

(下转第 128 页)

CaMg(CO₃)₂, 主要以 CaO 及 MgO 的形式存在于矿物中。

试剂: Pb(NO₃)₂、Na₂S·9H₂O、NaOH、HNO₃, 均为分析纯。

仪器设备: Z-2000 型原子吸收分光光度计; Zetasizer Nano zs90 粒度分析仪; FM-3 型制样粉碎机; XSB-88 型标准振筛机; ZR4-6 混凝实验搅拌机; TBZ-12H 型恒温磁力搅拌器。

1.2 试验方法

1.2.1 载体诱导沉淀效果试验及诱导沉淀过程 Zeta 电位变化

首先, 以含 Pb²⁺ 配水为处理对象, Na₂S·9H₂O 为沉淀剂, 利用单因素法在间歇搅拌反应器中考察无载体时 Pb²⁺ 去除的最佳条件; 然后, 在相同反应器、转速、Pb²⁺ 质量浓度、温度及无载体时 Pb²⁺ 最佳去除条件下, 考察不同载体存在时沉淀平衡时间和平衡剩余 Pb²⁺ 质量浓度, 对比不同载体的诱导效果, 并对诱导沉淀过程中载体的 Zeta 电位进行测定。单因素法试验结果表明, 在约 20℃、转速 300 r/min 时, 无载体时 Pb²⁺ 去除的最佳条件为: pH 为 6、加药比(Na₂S/Pb²⁺) 为 5:1。

(1) 载体诱导沉淀效果试验: 定量移取 500 mL pH 为 6、Pb²⁺ 质量浓度为 300 mg/L 的含 Pb²⁺ 配水于 1 L 反应器中, 用混凝实验搅拌机搅拌, 在转速为 300 r/min 时, 依次定量加入 50 g 粒级为 -150 ~ +109 μm 的单一载体、质量浓度为 34.69 g/L 沉淀剂 Na₂S·9H₂O; 沉淀剂加入后开始计时, 一定时间后

停止搅拌, 取样过 0.45 μm 滤膜, 利用原子吸收光谱法测定滤液中 Pb²⁺ 的剩余质量浓度。

(2) 诱导沉淀过程 Zeta 电位变化: 移取 50 mL pH 为 6、Pb²⁺ 质量浓度为 300 mg/L 的含 Pb²⁺ 配水于 100 mL 烧杯中, 用恒温磁力搅拌器搅拌, 在转速为 300 r/min 时, 依次定量加入 5 g 粒级为 -25 ~ +23 μm 的单一载体、质量浓度为 34.69 g/L 沉淀剂 Na₂S·9H₂O; 沉淀剂加入后开始计时, 一定时间后停止搅拌, 静置一定时间后取上层悬浮液进行 Zeta 电位测定。

1.2.2 不同体系中载体 Zeta 电位变化

分别考察去离子水体系、含 Pb²⁺ 配水体系、沉淀体系中载体 Zeta 电位随 pH 的变化, 获得等电点。试验中, 分别定量移取 50 mL 去离子水、Pb²⁺ 质量浓度为 300 mg/L 的含 Pb²⁺ 配水于 100 mL 烧杯中, 用恒温磁力搅拌器搅拌, 用 1 mol/L 的 NaOH 和 HNO₃ 调节体系 pH 到设定值; 在转速为 300 r/min 时, 离子水体系、含 Pb²⁺ 配水体系定量加入 5 g 粒级为 -25 ~ +23 μm 的单一载体, 接着向沉淀体系中加入质量浓度为 34.69 g/L 沉淀剂 Na₂S·9H₂O, 搅拌 5 min, 静置一定时间后取上层悬浮液进行 Zeta 电位测定。根据 Zeta 电位为 0 mV 时所对应的 pH 获得不同载体、不同体系的等电点。

1.2.3 数据分析方法

利用单因素法在间歇搅拌反应器中考察无载体时 Pb²⁺ 去除的最佳条件, 在此条件下, 通过考察平衡时间和平衡剩余 Pb²⁺ 质量浓度, 对比石英砂、长石及白云石的诱导沉淀效果, 从中选出最佳载体, 并

(上接第 126 页)

间为 1.5 h, V(N,N-二羟甲基叔丁胺):V(冰醋酸):m(抗坏血酸):m(S)=0.278:0.014:0.014:1.000, 缩合反应温度为 55℃, 缩合反应时间为 2 h, V(1-甲基-4-氨基哌嗪):m(S)=0.463:1.000, 此时, 利福平粗品收率可达 86.56%, 纯度为 92.69%。缩短了利福平的生产周期, 提高了利福平的收率 and 产品质量。

参考文献

- [1] Havlir D V, Dube F R, Forthal D N, et al. Prophylaxis against disseminated mycobacterium avium complex with weekly azithromycin, daily rifabutin, or both. California collaborative treatment group[J]. N Engl J Med, 1996, 335(6):392-398.
- [2] Aristoff P A, Garcia G A, Kirchhoff P D, et al. Rifamycins-obstacles and opportunities[J]. Tuberculosis, 2010, 90(2):94-118.
- [3] Burman W J, Gallicano K, Peloquin C. Comparative pharmacokinetics

and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials[J]. Clin Pharmacokinetics, 2001, 40(5):327-341.

- [4] 俞文和, 杨纪根. 抗生素工艺学[M]. 辽宁: 辽宁科学技术出版社, 1989:461-462.
- [5] 刘旭. 一种用于生产药物利福平的中间体原料: 中国, CN101348441A[P]. 2009-01-21.
- [6] 薛荔. 优质利福平的制备方法: 中国, CN101486716[P]. 2009-07-22.
- [7] Gianantonio A, Fabrucci A, Sacerdoti S, et al. Process for rifamycins; America, US3542762[P]. 1970-11-24.
- [8] Marsili L, Pasqualucci C. Process for the preparation of 3-iminoethyl derivatives of rifamycin SV; America, US3963705[P]. 1976-06-15.
- [9] Tiberio B. Process for the preparation of rifampicin; America, US4174320[P]. 1979-11-13.
- [10] 游金莺. 利福霉素类半合成抗生素的研究概况[J]. 抗生素, 1985, 10(4):223-229.
- [11] 董亚梅, 陈葵, 朱家文. 反应体系 pH 值对利福霉素哌嗪环合反应的影响[J]. 中国抗生素, 2006, 31(10):646-648. ■