



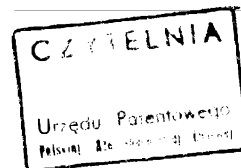
Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 85 11 21 /P. 274472/

Pierwszeństwo 85 10 23 Republika
Federalna Niemiec

Zgłoszenie ogłoszono: 86 12 02

Opis patentowy opublikowano: 1990 02 28



Int. Cl.⁴ C07D 407/02
A61K 31/36

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Dr. Madaus GmbH u. Co., Kolonia /Republika Federalna
Niemiec/

SPOSÓB WYTWARZANIA SYLIBININY NIE ZAWIERAJĄCEJ IZOSYLIBINY

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania sylibininy, nadającej się do zastosowania jako składnik środków leczniczych.

Ostropest plamisty - *Silybum marianum* /L./ Gaertn. /*Carduus marianus* L./ jest znana od starożytności rośliną leczniczą. Z występujących w owocach tej rośliny flawolignanów został wyodrębniony składnik sylibina przez R.Münster'a, por. dysertacja R.Münster, Monachium, 1966. Struktura chemiczna tego związku została wyjaśniona przez A.Pelter'a i R.Hänsel'a, por. Tetrahedron Letters, Londyn, tom 25, str. 2911-2916 /1968/.

Wiadomo, że sylibina, wcześniej zwana również sylimarina I, jest cennym lekiem wątrobowym, por. opis patentowy RFN nr 17 67 666. Techniczny sposób wytwarzania sylibiny /sylimariny I/ jest opisany np. w opisie patentowym RFN nr 19 23 082, co zostało uwzględnione w części przedznajmiennej zastrzeżenia 1.

Już w roku 1974 H.Wagner, P.Diesel i M.Seitz, Arzneimittelforschung, tom 24 /4/, str. 466-471, w odniesieniu do silibiny przypuszczali, że istnieją dwa izomery położenia, mianowicie sylibina i izosylibina. To przypuszczenie zostało sprecyzowane i potwierdzone eksperymentalnie przez A.Arnone, Merlini i A.Zanarotti, Journal Chemical Society Chem. comm., 1979, tom 16, str. 696/97. Zgodnie z tym znana sylibina składa się z dwóch różnych związków, mianowicie związków o następujących wzorach strukturalnych: o wzorze 1 sylibinina /A/ i o wzorze 2 izosylibina /B/.

Z tych wzorów strukturalnych widać, że w przypadku tych związków chodzi o izomery położenia. Związek /A/ o wzorze 1 ma ostatnio oznaczenie INN sylibinina. To oznaczenie stosowane jest również w niniejszym opisie dla związku /A/ o wzorze 1. Obydwa wyżej określone związki A i B były dotychczas wydzielane i wytwarzane tylko w ilościach analitycznych, a o działaniach farmakologicznych poszczególnych izomerów nic nie wiadomo.

Zadaniem wynalazku jest dlatego dostarczenie sposobu wytwarzania sylibiny nie zawierającej izosylibiny, przydatnej do zastosowania w środkach farmaceutycznych.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania sylibiny o wzorze 1, nie zawierającej izosylibiny, przy czym wysuszone owoce *Silybum marianum* L.Gaertn. uwalnia się od głównej ilości tłustego oleju, rozsadzając komórki owoców przez zastosowanie wysokiego ciśnienia mechanicznego, potem wyłoczyny zawierające jeszcze resztkową ilość oleju wynoszącą 5-10% poddaje się wyczerpującej ekstrakcji za pomocą octanu etylu, odparowuje się octan etylu, potem otrzymaną suchą pozostałość w ilości 2 procent wagowych rozpuszcza się w złożonej z metanolu i wody podfazie trójskładnikowej mieszaniny rozpuszczalników złożonej z 95 części wagowych metanolu, 5 części wagowych wody i 100 części wagowych eteru naftowego o temperaturze wrzenia 40-60°C, w celu usunięcia kłaczkowatych cząstek substancji stałej odwirowuje się klarownie i w tym układzie rozpuszczalników suchą pozostałość poddaje się multiplikatywnemu, równomiernemu rozdzielaniu w przeciwnym kierunku, przy czym zostaje utrzymany ogólny przepływowy stosunek objętościowy fazy górnej do fazy dolnej równy 1:1, a następnie z odpływającej fazy dolnej przez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha wyodrębnia się 70-80%-wą mieszaninę polihydroksyfenylochromanonu /syylimariny I-IV = syylimariny grupy I-IV/ jako brunatnawy proszek, który to sposób charakteryzuje się tym, że w etapie a/ jedną część wagową otrzymanego brunatnawego proszku, który w dalszym ciągu przyjmuje się jako odniesienie ilościowe, przeprowadza się w zawiesinę w 0,7 - 1,5 częściach wagowych octanu etylu nasyconego wodą, a otrzymaną zawiesinę pozostawia się do odstania w ciągu jednego do dwóch dni i odsącza się osad, w etapie b/ otrzymany osad przemycza się za pomocą 0,07 - 0,15 części wagowych zimnego, nasyconego wodą octanu etylu i suszy w temperaturze 30-50°C pod zmniejszonym ciśnieniem, w etapie c/ ten produkt rozpuszcza się w 30-50 częściach wagowych suchego /bezwodnego/ octanu etylu w temperaturze wrzenia, poddaje obróbce za pomocą 0,2 - 0,4 części wagowych węgla aktywnego w ciągu dwóch godzin pod chłodnicą zwrotną, sączy i przesącza zatęża się w temperaturze 30-50°C pod zmniejszonym ciśnieniem do 1/12 ilości rozpuszczalnika użytego do rozpuszczania, w etapie d/ do koncentratu dodaje się 0,5-0,8 części wagowych nasyconego wodą octanu etylu, a wytrąconą sylibinę odsącza się po upływie 5-10 godzin i w etapie e/ sylibinę przeprowadza się w zawiesinę w 0,9-1,8 częściach wagowych technicznego octanu etylu, ponownie sączy, suszy wstępnie pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 30-50°C, wstępnie wysuszony produkt poddaje się zmieleniu i suszy ponownie w temperaturze 30-50°C pod zmniejszonym ciśnieniem.

Stosowany jako produkt wyjściowy w etapie a/ brunatnawy proszek lub surowa sylimarina stanowi mieszaninę złożoną z sylimariny I-IV. Przez obróbkę surowej sylimariny za pomocą nasyconego wodą octanu etylu następuje w zasadzie oddzielenie głównych ilości sylimariny II do IV /sylibiny jest sylimariną I/ i 20-30% substancji towarzyszących w surowej sylimarinie, jak również część izosylibiny. Otrzymuje się w ten sposób w etapie b/ surową sylibinę z wydajnością, zależnie od jakości surowej sylimariny 80-85% /w odniesieniu do zawartości sylibiny w surowej sylimarinie/ i o zawartości 80-84%.

Surowa sylibina jest, jak opisano w stanie techniki, mieszaniną złożoną z izosylibiny i sylibiny w stosunku około 1:4. W etapach c/ do e/ następuje oddzielenie głównych ilości izosylibiny od sylibiny, jak również reszty innych, wyżej wymienionych składników.

Szczególną zaletą tego sposobu oddzielania jest zastosowanie tylko jednego, jedyne rozpuszczalnika, mianowicie octanu etylu, oczywiście o różnych zawartościach wody. Istotne jest przy tym stosowanie w etapie c/ bezwodnego octanu etylu i w etapie d/ octanu etylu nasyconego wodą. Otrzymuje się za pomocą sposobu według sposobu wynalazku sylibinę z wydajnością 79-85% /w odniesieniu do sylibiny w surowej sylibinie/ i z zawartością 96-98% sylibiny.

Szczególnie korzystna postać wykonania sposobu według wynalazku polega na tym, że w etapie a/ jedną część wagową brunatnawego proszku przeprowadza się w zawiesinę w 0,9 częściach wagowych nasyconego wodą octanu etylu, pozostawia do odstania na 48 godzin w

temperaturze pokojowej i odsącza otrzymany osad, w etapie b/ osad przemywa się za pomocą 0,09 części zimnego nasyconego wodą octanu etylu i suszy w ciągu 48 godzin w temperaturze 40°C pod zmniejszonym ciśnieniem, w etapie c/ otrzymany produkt rozpuszcza się w 36 częściach wagowych suchego octanu etylu w temperaturze wrzenia, ogrzewa z 0,36 częściami wagowymi węgla aktywnego w ciągu dwóch godzin pod chłodnicą zwrotną, sączy i zatęża w temperaturze 50°C pod zmniejszonym ciśnieniem do 1/12 ilości rozpuszczalnika, użytego do rozpuszczenia, w etapie d/ do koncentratu dodaje się w temperaturze pokojowej 0,6 części wagowych nasyconego wodą octanu etylu, pozostawia do odstanienia na 12 godzin w temperaturze pokojowej i odsącza się wytrącony produkt, w etapie e/ ten produkt dwukrotnie przeprowadza się w zawiesinę każdorazowo w 1,8 częściach wagowych technicznego octanu etylu i sączy, suszy wstępnie w ciągu 24 godzin pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C, poddaje zmieleniu i suszy dodatkowo w ciągu 48 godzin pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C.

Stwierdzono, że sylibinina nie zawierająca izosylibiny jest bardzo przydatna do celów farmaceutycznych. Nieoczekiwanie okazało się, że ma ona istotne zalety w porównaniu z innymi znanymi składnikami ekstraktów *Silybum-marianum*. Jest ona szczególnie przydatna do leczenia marskości wątroby i toksyczno-metabolicznych uszkodzeń wątroby. Może być również stosowana zapobiegawczo tak, że przedstawione szkody w ogóle nie występują.

Środki lecznicze, które zawierają sylibininę otrzymaną sposobem według wynalazku, są stosowane najczęściej systemicznie, np. w postaci pigułek, kapsułek, roztworów, w zwykłych nośnikach i ewentualnie razem ze zwykłymi substancjami pomocniczymi. Dawka dzienna dla dorosłego człowieka wynosi około 50-500 mg, zależnie od stanu pacjenta i objawów choroby.

P r z y k ł a d I. Wytwarzanie sylibininę nie zawierającej izosylibiny.

500 g mieszaniny polihydroksyfenylochromanonu /sylimarina I-IV = sylimarina grupy I-IV; zawartość około 70%/, otrzymanego według kolumny 8, wiersz 14-19 opisu patentowego RFN nr 19 23 082, który niniejszym przyjmuje się za odniesienie, przeprowadza się w zawiesinę w 2 kg metanolu = 2,53 l i ogrzewa mieszając w ciągu 15 minut do wrzenia. Z tak otrzymanego roztworu może po tym czasie już wytrącić się nieco sylibininę. Następnie odciaga się pod zmniejszonym ciśnieniem 0,75-1,25 kg = 0,96-1,58 l metanolu i pozostałość pozostawia się do odstanienia w ciągu 10-28 dni w temperaturze pokojowej. Wytrąconą sylibininę sączy się i przemywa dodatkowo dwukrotnie za pomocą każdorazowo 50 ml zimnego metanolu. Po wysuszeniu w temperaturze 40°C pod zmniejszonym ciśnieniem wyodrębnioną surową sylibininę oczyszcza się dalej następująco:

60 g surowej sylibininę rozpuszcza się w 3 l technicznego octanu etylu przy jednoczesnym ogrzewaniu; następnie dodaje się 20 g węgla aktywnego i miesza w ciągu następnych 2 godzin w warunkach chłodnicy zwrotnej. Potem sączy się klarująco i roztwór w temperaturze 50°C pod zmniejszonym ciśnieniem zatęża się do około 250 ml. Koncentrat miesza się w ciągu 15 minut z zastosowaniem przyrządu Ultra-Turrax i mieszając dodaje się 25 ml metanolu. Następnie pozostawia się mieszaninę do odstanienia w ciągu nocy w temperaturze pokojowej. Przed odsączeniem na nuczy wytrąconej przy tym sylibiny miesza się ponownie w ciągu 5 minut również za pomocą przyrządu Ultra-Turrax. Odsączony na nuczy osad przemywa się dodatkowo 2 razy za pomocą 50 ml octanu etylu i suszy w suszarce próżniowej w ciągu nocy w temperaturze 40°C. Następnie produkt poddaje się zmieleniu i w tych samych warunkach suszy się dodatkowo w ciągu 40 godzin.

P r z y k ł a d II. Wytwarzanie sylibininę, nie zawierającej izosylibiny.

1 kg mieszaniny polihydroksyfenylochromanonu /sylimarina I-IV = sylimarina grupy I-IV; zawartość około 70%/, jako brunatnawy proszek zwany tutaj również surową sylimariną, który otrzymano według kolumny 8, wiersz 14-19 opisu patentowego RFN nr 19 23 082, który niniejszym przyjmuje się za odniesienie, przeprowadza się w zawiesinę w 1 l nasyconego wodą octanu etylu w ciągu 30 minut za pomocą Turrax'u. Po odstaniu w ciągu 48 godzin w temperaturze pokojowej odsącza się osad, przemywa za pomocą 100 ml zimnego, nasy-

conego wodą octanu etylu i suszy w ciągu 48 godzin w temperaturze 40°C pod zmniejszonym ciśnieniem.

Wydażność tego produktu pośredniego, surowej sylibiny, wynosi zależnie od jakości surowej sylimariny, 80-85%, w odniesieniu do zawartości sylibiny, w surowej sylimarynie, przy zawartości 80-84%.

Surową sylibinę rozpuszcza się w 40 ml suchego octanu etylu w temperaturze wrzenia, gotuje z 360 mg węgla aktywnego w ciągu 2 godzin pod chłodnicą zwrotną, sączy i zależa do ogólnej objętości 3330 ml w temperaturze 50°C pod zmniejszonym ciśnieniem. Do tego roztworu dodaje się, przy intensywnym mieszaniu, w temperaturze pokojowej, 667 ml nasyconego wodą octanu etylu. Po upływie 1-3 godzin rozpoczyna się następnie krystalizacja sylibiny. Po odstaniu w ciągu nocy oddziela się wytrąconą sylibinę przez sączenie, dwukrotnie przeprowadza się w zawiesinę za pomocą po 1200 ml technicznego octanu etylu w ciągu 5-10 minut, ponownie sączy i suszy wstępnie w ciągu 24 godzin pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C. Po zmieleniu suszy się dodatkowo w ciągu 48 godzin w temperaturze 40°C pod zmniejszonym ciśnieniem.

Wydażność sylibiny, w odniesieniu do sylibiny w surowej sylibinie, wynosi 79-85% przy zawartości 96-98,5% sylibiny, zależnie od jakości surowej sylibiny.

Kliniczne doświadczenia z zastosowaniem sylibiny. Toksyczne uszkodzenia wątroby w ostatnich dziesięcioleciach spotęgowały się nadzwyczaj silnie. Najczęstszą przyczyną uszkodzeń jest nadal alkohol.

Przez kontrolowane studia można było wykazać wyższość sylibiny w porównaniu z terapią pozorną /placebo/ albo innymi terapiami porównawczymi. W podwójnym studium u 66 pacjentów z alkoholotoksycznymi uszkodzeniami wątroby zbadano sylibinę /n=31/ wobec placebo /n=35/ wyrywkowo.

Statystycznie obliczone wyniki wykazały, że sylibina znacząco przewyższa placebo. Uderzający był przy tym znacznie krótszy czas wyleczenia w porównaniu z placebo. W drugim podwójnym ślepyim studium u 76 pacjentów, z których 39 otrzymało sylibinę i 37 terapię kontrolną, różnice na korzyść sylibiny były wysoce znaczące.

W przypadku wątrobotoksycznych oddziaływań narkozy w związku z operacjami narządów brzucha można było wykazać, że przedoperacyjne podawanie sylibiny obniża znacząco poperacyjny wzrost enzymów wątrobowych we krwi. Również dziś coraz częstsze, indukowane przez określone środki lecznicze, uszkodzenie wątroby jest skutecznie udaremniane przez sylibinę. Można to było wykazać na przykładzie indukowanej przez fenylhydantoinę hepatozy, przy której pomimo dalszego przepisania niezbędnego, zapobiegającego drgawkom, medykamentu przy jednoczesnym podawaniu sylibiny wszystkie wartości laboratoryjne normalizują się w ciągu krótkiego czasu.

Dalsze badania u chorych na schizofrenię i z ciężkimi uszkodzeniami wątroby przez przepisywanie chloropromazyny wykazały również dodatnie działanie sylibiny. Inne doświadczenia dotyczą zapobiegania działaniom uszkadzającym wątrobę np. chlorochiny albo asparaginy. W zawodowych uszkodzeniach wątroby można było u wszystkich leczonych pacjentów znacznie polepszyć patologicznie podwyższone wyniki badań laboratoryjnych, niezależnie od każdorazowej przyczyny albo możliwych dodatkowych schorzeń.

Poza tym istnieje dość wskazówek, że sylibina również przy chroniczno-zapalnych schorzeniach wątroby i marskości wątroby wywołuje istotną poprawę. Np. pacjentów z marskością wątroby w ramach długotrwałego studium poddano badaniom w podwójnym ślepyim studium wyrywkowym, w którym badano sylibinę wobec placebo. Kryterium oceny efektu terapeutycznego stanowił przede wszystkim czas przeżycia. Tutaj okazała się wyraźna wyższość sylibiny w porównaniu z leczeniem placebo.

Porównanie działania między sylibiną, izosylibiną i sylibiną /mieszanina sylibiny i izosylibiny/ w modelu intoksykacji falloidynej i przeodymowej u myszy po daniu dożylnym.

Działanie antyhepatotoksyczne sylibiny, izosylibiny, sylibiny jako soli N-metyloglikaminowych badano w dawkach 50 i 100 mg·kg⁻¹, w odniesieniu do sylibiny, w modelu

zatrucia falloidydnowego i przeodymowego myszy po aplikacji dożylniej. Aplikację substancji próbnej przeprowadzono 1 godzinę przed falloidydną lub 1 godzinę przed i 6 godzin, 24 godziny i 48 godzin po przeodymie. Oceniono w przypadku zatrucia falloidydnowego wskaźnik przeżycia i w przypadku zatrucia przeodymowego różne parametry surowicy i wątroby 72 godziny po intoksykacji.

W przypadku intoksykacji falloidydnowej wskaźnik przeżycia po sylibininie wynosił w obydwóch dawkach 100%, przy zastosowaniu pozostałych substancji wskaźnik przeżycia nie przekroczył wartości 40%, jaki uzyskano u nieleczonych, uszkodzonych zwierząt kontrolnych.

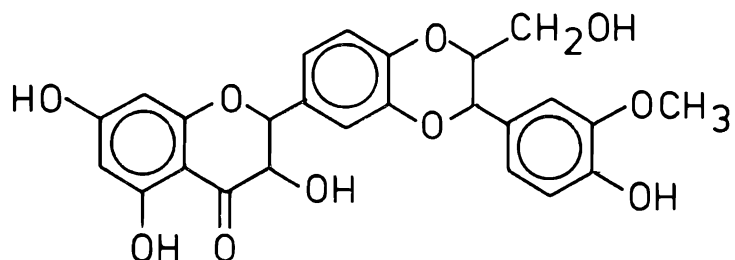
Izosylibina okazała się w związku z intoksykacją przeodymową bardziej nietolerowana tak, że dawka $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ musiała być podzielona na dwie aplikacje częściowe.

Z a s t r z e ż e n i a p a t e n t o w e

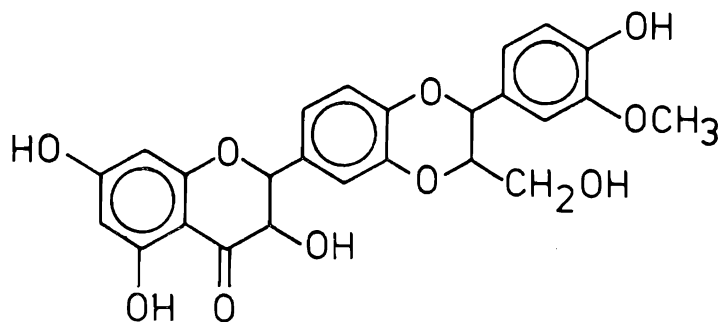
1. Sposób wytwarzania sylibiny o wzorze I, nie zawierającej izosylibiny, przy czym wysuszone owoce *Silybum marianum* L. Gaertn. uwalnia się od głównej ilości tłustego oleju, rozsadzając komórki owoców przez zastosowanie wysokiego ciśnienia mechanicznego, następnie wytłoczyny, zawierające jeszcze resztkową ilość oleju, wynoszącą 5-10%, poddaje się wyczerpującej ekstrakcji za pomocą octanu etylu, odparowuje się octan etylu, potem otrzymaną suchą pozostałość rozpuszcza się w ilości 2 procent wagowych w złożonej z metanolu i wody podfazie trójskładnikowej mieszaniny rozpuszczalników, złożonej z 95 części wagowych metanolu, 5 części wagowych wody i 100 części wagowych eteru naftowego o temperaturze wrzenia $40-60^{\circ}\text{C}$, usuwa się kłaczkowate cząstki substancji stałej przez odwirowanie i w tym układzie rozpuszczalników suchą pozostałość poddaje się multiplikatywnemu, równomiernemu rozdzielaniu w przeciwnym kierunku, przy czym pozostaje utrzymany ogólny przepływowy stosunek objętościowy fazy górnej do fazy dolnej równy 1:1 i następnie z odpływającą fazą dolną, przez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha, wyodrębnia się 70-80%-wą mieszaninę polihydroksyfenylochromanonu jako brunatny proszek, z n a m i e n n y t y m, że jedną część wagową brunatnego proszku, który następnie przyjmuje się jako odniesienie ilościowe, przeprowadza się w zawiesinę w 0,7-1,5 części wagowych nasyconego wodą octanu etylu, a otrzymaną zawiesinę pozostawia się do odstania na jeden do dwóch dni, po czym odsącza się osad, który przemywa się za pomocą 0,07-0,15 części wagowych zimnego, nasyconego wodą octanu etylu i suszy w temperaturze $30-50^{\circ}\text{C}$ pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie ten produkt rozpuszcza się w 30-50 częściach wagowych suchego, bezwodnego octanu etylu w temperaturze wrzenia i poddaje się obróbce za pomocą 0,2-0,4 części wagowych węgla aktywnego w ciągu dwóch godzin pod chłodnicą zwrotną, sączy i przesącz zatęże się, w temperaturze $30-50^{\circ}\text{C}$ pod zmniejszonym ciśnieniem, do 1/12 ilości rozpuszczalnika, użytego do rozpuszczania, po czym do koncentratu dodaje się 0,5-0,8 części wagowych nasyconego wodą octanu etylu, a wytrąconą sylibininę odsącza się po upływie 5-10 godzin i następnie przeprowadza się ją w zawiesinę w 0,9-1,8 częściach wagowych technicznego octanu etylu, ponownie sączy, suszy wstępnie pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze $30-50^{\circ}\text{C}$, miele i ponownie suszy w temperaturze $30-50^{\circ}\text{C}$ pod zmniejszonym ciśnieniem.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że jedną część wagową brunatnego proszku przeprowadza się w zawiesinę w 0,9 częściach wagowych nasyconego wodą octanu etylu, pozostawia do odstania na 48 godzin w temperaturze pokojowej, po czym otrzymany osad odsącza się i przemywa się go za pomocą 0,09 części zimnego nasyconego octanu etylu, suszy w ciągu 48 godzin w temperaturze 40°C pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie otrzymany produkt rozpuszcza się w 36 częściach wagowych suchego octanu etylu w temperaturze wrzenia, ogrzewa się z 0,36 częściami wagowymi węgla aktywnego w ciągu dwóch godzin pod chłodnicą zwrotną, sączy i zatęże w temperaturze 50°C pod zmniejszonym ciśnieniem do 1/12 ilości rozpuszczalnika, użytego do rozpuszczenia, po czym do koncen-

tratu dodaje się w temperaturze pokojowej 0,6 części wagowych nasyconego wodą octanu etylu, pozostawia do odstanienia na 12 godzin w temperaturze pokojowej i odsącza się wytrącony produkt, który następnie przeprowadza się dwukrotnie w zawiesinę, każdorazowo w 1,8 częściach wagowych technicznego octanu etylu i sączy, suszy wstępnie w ciągu 24 godzin pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C, miele i suszy dodatkowo w ciągu 48 godzin pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C.



WZÓR 1



WZÓR 2