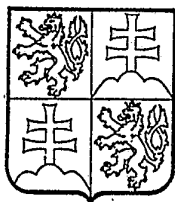


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

273 610

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl. ⁵
C 07 D 407/02
A 61 K 31/35

(21) PV 8378-85.G
(22) Přihlášeno 20 11 85
(30) Právo přednosti od 22 11 84 DE
(P 34 42 639)

(40) Zveřejněno 14 08 90
(45) Vydáno 13 03 92

(72) Autor vynálezu

BRAATZ REINHARD dr., BONN, GÜRLER KLAUS dr.,
BERGISCH GLADBACH, HALBACH GÜNTER dr.,
SOICKE-HARTWIG dr., KÖLN, SCHMIDT KARLHEINZ
prof.dr.dr., WANKHEIM (DE)

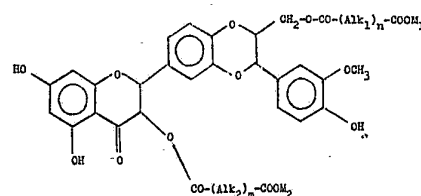
(73) Majitel patentu

MADAUS AKTIENGESellschaft, KÖLN (DE)

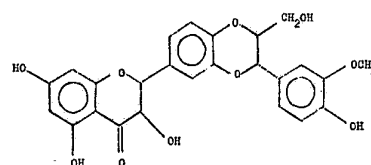
(54)

Způsob výroby nových derivátů silibininu

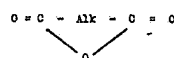
(57) Způsob výroby nových derivátů silibininu obecného vzorce I, kde n a m nezávisle znamenají 0 nebo 1, Alk₁ a Alk₂ nezávisle znamenají alkylen nebo alkenylen s až 4 atomy uhlíku, M₁ a M₂ nezávisle znamenají vodík nebo atom alkálického kovu, spočívá v tom, že se silibinin vzorce A rozpustí v pyridinu a za míchání nechá reagovat s anhydridem dikarboxylové kyseliny obecného vzorce II, v němž Alk znamená Alk₁ nebo Alk₂ definovaný svrchu, potom se přidá ethanol až do vzniku homogenní směsi, načež se za intenzivního míchání pomalu přidává voda, poté se reakční směs zředí ethylacetátem, promývá kyselou vodou nasycenou ethylacetátem, ethylacetátová fáze se odpaří, vyjme ethanol a popřípadě působením hydroxidu alkálického kovu se převede na sůl. Vyráběné sloučeniny jsou vhodné jako léčiva při léčení popálenin, otrav houbami a onemocnění jater.



(I)



(A)



(II)

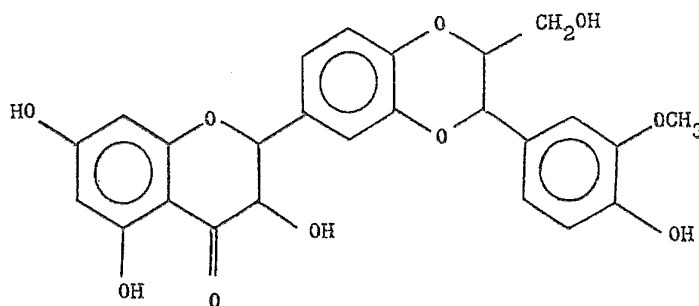
Předložený vynález se týká způsobu výroby nových derivátů flavolignanů, tj. nových derivátů silibininu, které mají cenné farmakologické vlastnosti a mohou se používat jaké léčiva.

Ostropestřec mariánský - *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.) je již od starověku známou léčivou rostlinou. Z flavolignanů vyskytujících se v plodech této rostliny byla izolována R. Münsterem jedna složka zvaná silybin (srov. Dissertation R. Münster, München, 1966). Chemická struktura této sloučeniny byla vysvětlena A. Pelterem a R. Hänselem, srov. Tetrahedron Letters, Londýn, sv. 25, str. 2911 - 2916 (1968).

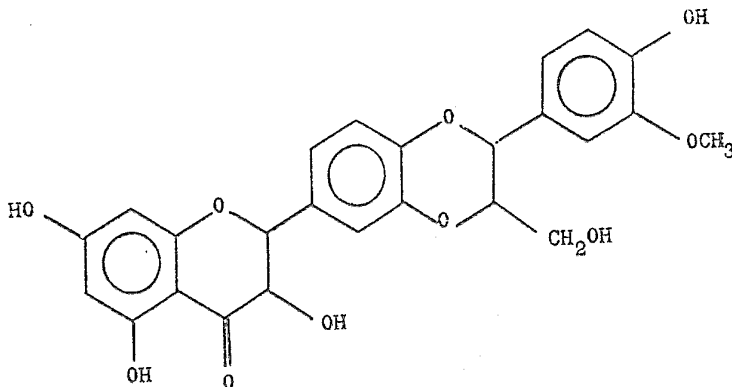
Je známo, že silybin, nazývaný dříve také jako silymarin I, je cenným jaterním terapeutikem (srov. DE-AS 17 67 666). Technický způsob výroby silybinu (tj. silymarinu I) se popisuje například v DE-AS 19 23 082.

Již v roce 1974 se H. WAGNER, P. DIESEL a M. SEITZ, Arzneimittelforschung, sv. 24 (4), str. 466 až 471, pokud jde o silybin, domnívali, že existují dva polohové isomery, tj. silybin a isosilybin.

Tuto domněnku upřesnili a experimentálně potvrdili A. Arnone, L. Merlini a A. Zanarotti, Journal Chemical Society Chem. Comm., 16, 696 - 697 (1979). Podle toho sestává známý silybin ze dvou různých sloučenin, tj. ze sloučenin dále uvedených strukturních vzorů A a B:



(A) silibinin



(B) isosilybin

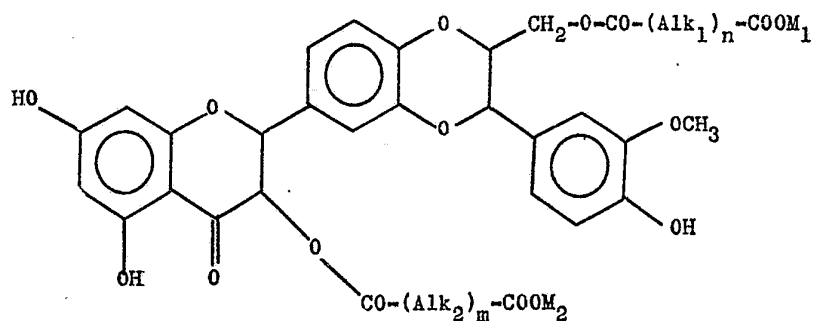
Z těchto strukturních vzorců je patrné, že se u těchto sloučenin jedná o polohové isomery. Sloučenina vzorce A se nově označuje jako silibinin. Toto označení se od této chvíle používá v popisu předloženého vynálezu pro sloučeninu vzorce A.

Terapeutickému použití silybinu je na překážku skutečnost, že silybin je ve vodě prakticky nerozpustný, takže nebylo možno vyrobit injekční roztoky nebo přípravky obsahující silybin, ve kterých je potřebná určitá rozpustnost této látky ve vodě. V německém patentovém spisu DE.PS 19 63 318 se sice popisují deriváty silybinu, které mají určitou rozpustnost ve vodě, přičemž se však jedná o velmi komplexní směs poloesterů jantarové kyseliny. Tato směs je takto komplexní proto, že v silybinu je přítomno pět esterifikovatelných hydroxylových skupin, silybin obsahuje kromě toho oba shora uvedené polohové isomery a jantarová kyselina používaná k esterifikaci je dikarboxylovou kyselinou, která může tvořit jak monoestery, tak i diestery. Pro farmaceutické účely je však produkt, který sestává z nepřehledného počtu nej-
různějších nejasných sloučenin, neupotřebitelný.

Úkolem předloženého vynálezu bylo proto připravit ve vodě rozpustné deriváty silibinu, které by byly vhodné pro farmaceutické účely, a které by bylo možno přesně charakterizovat jako chemická individua.

Nyní bylo zjištěno, že tyto požadavky splňují deriváty silibininu určitých alkan- a alkylendikarboxylových kyselin.

Předmětem předloženého vynálezu je tudíž způsob výroby nových derivátů silibininu obecného vzorce I



(I),

ve kterém

$n + m$ znamenají vždy nezávisle na sobě číslo 0 nebo 1,

Alk_1 a Alk_2 znamenají nezávisle na sobě alkylenový zbytek s 1 až 4 atomy uhlíku nebo alkenylenový zbytek se 2 až 4 atomy uhlíku a

M_1 a M_2 znamenají nezávisle na sobě atom vodíku nebo atom alkalického kovu.

Výhodně se postupem podle vynálezu připravují sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém

a a m znamenají nezávisle na sobě číslo 0 nebo číslo 1,

Alk_1 a Alk_2 znamenají vždy alkylenový zbytek se 2 atomy uhlíku a

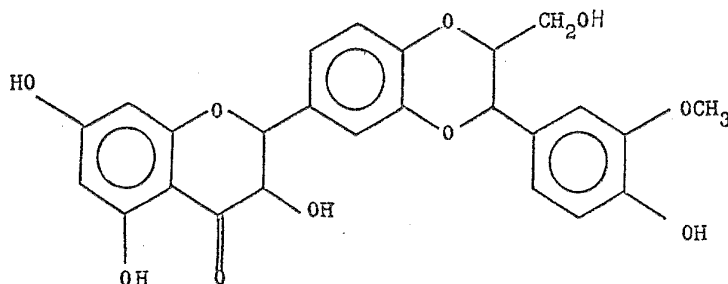
M_1 a M_2 znamenají nezávisle na sobě atom alkalického kovu.

Výhodně se připravují takové sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém n a m , Alk_1 a Alk_2 , jakož i M_1 a M_2 mají vždy shodné významy.

Zvláště výhodně se postupem podle vynálezu připravuje dvojsodná sůl silibinin-C-2',3'-dihydrogensukcinátu.

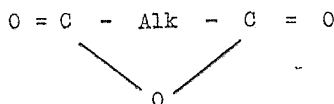
U sloučenin vyráběných postupem podle vynálezu jsou hydroxylové skupiny silibininu, které nejsou vázány na benzenové jádro, částečně nebo zcela esterifikovány, například oxalovou kyselinou, malonovou kyselinou, jantarovou kyselinou, adipovou kyselinou, maleinovou kyselinou nebo fumarovou kyselinou. Výhodně jsou obě nearomaticky vázané hydroxylové skupiny silibininu jednoduše esterifikovány některou ze shora uvedených karboxylových kyselin.

Podle tohoto vynálezu se nové shora definované deriváty silibininu obecného vzorce I připravují tím, že se asi 1 díl hmotnostní silibininu vzorce A



(A),

rozpustí v 1 až 2 dílech hmot. pyridinu a na tento roztok se působí 1 až 3 díly hmot. anhydridu dikarboxylové kyseliny obecného vzorce



ve kterém

Alk znamená některý ze shora definovaných zbytků Alk_1 a Alk_2 ,

za míchání, potom se přidá ethanol až do vzniku homogenní směsi, potom se za intenzivního míchání pozvolna přidá voda, přičemž se přítomné estery aromaticky vázaných hydroxylových skupin hydrolyzují, jakmile je tato hydrolyza dokončena, zředí se reakční směs ethylacetátem, promyje se okyselenou vodou nasycenou ethylacetátem, ethylacetátová fáze se zahustí, vyjme se ethanol a převede se působením alkoholického roztoku hydroxidu alkalického kovu na sůl volného zbytku karboxylové kyseliny.

Reakce s anhydridem dikarboxylové kyseliny se provádí výhodně při teplotě 40 až 50 °C. Hodnota pH kyselé promývací vody nasycené ethylacetátem se udržuje výhodně na asi 1,5 až 2,4.

Sloučeniny vyráběné postupem podle vynálezu, zejména dvojsodná sůl silibinin-C-2',3'-dihydrogensukcinátu, vykazují překvapivě výrazný farmakologický účinek při léčbě popálenin. Kromě toho si zachovávají plnou farmakologickou účinnost známého silibinu jakožto jaterní

terapeutikum. Tyto sloučeniny jsou zvláště vhodné k léčení cirhózy jater a toxicko-metabolických poškození jater.

Sloučeniny vyráběné postupem podle předloženého vynálezu se překvapivě ukázaly také jako mimořádně účinné při léčení otrav houbami, zejména velmi nebezpečné otravy muchomůrkou hlíz-natou (*Amanita phalloides*). Uvedenými sloučeninami se dají také překvapivě dobře léčit otravy halogenovanými organickými rozpouštědly, jako tetrachlormethanem, trichlorethylenem, chloroformem atd. Při preventivním použití zamezují sloučeniny vyráběné podle vynálezu shora uvede-ným poškozením.

Předložený vynález se proto také týká léčiv, které obsahují sloučeniny vyráběné postupem podle vynálezu. Tato léčiva se používají většinou systemicky, například ve formě pilulek, kapslí, roztoků, spolu s obvyklými nosiči a popřípadě spolu s obvyklými pomocnými látkami. Denní dávka pro dospělé lidi činí asi 50 až 500 mg vždy podle stavu pacienta a podle závaž-nosti příznaků choroby.

V další části se popisují biologické pokusy s dvojsodnou solí silibinin-C-2',3-dihydro-gensukcinátu (Sili-suc-na).

Symptomy vyskytující se při popáleninách jsou vyvolávány zejména intoxikací produkty termické nekrózy tkáně. Důkaz, že autointoxikační procesy po těžkých popáleninách kůže nesou tuto odpovědnost, byl prováděn různým způsobem. Zvláště přesvědčivé jsou zkřížené transplan-tace popálené a nepopálené kůže na zdravá, popřípadě popálená zvířata (příjemce), přičemž se ukázalo, že u nepopálených příjemců přichází popálená kůže nazmar, zatímco v případě popále-ných příjemců zdravé kůže nebylo možno zjistit žádné škodlivé účinky (srov. K.H. Schmidt a další, *Neuere Aspekte zur Autointoxikation nach schweren Verbrennungen; Die Verbrennungs-krakheit* (F. W. Ahnefeld a další, ods. I), Springer, Berlin 1982, str. 45 - 52).

Při popáleninách kůže dochází k uvolňování nebo k novému vzniku celé řady chemických sloučenin. Přes jejich velký počet se podařilo vysvětlit strukturu některých těchto slouče-nin. Bylo možno kromě jiného prokázat, že sloučeniny, vznikající při popáleninách kůže, jsou podobné takovým sloučeninám, které vznikají při peroxidaci lipidů. Existují také analogie po-kud jde o toxické účinky těchto látek. Zvláště výrazný je vznik toxicky účinných nasycených a nenasycených aldehydů s různou délkou řetězce jako důsledek peroxidace lipidů (Benedetti a další, *Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the per-oxidation of liver microsomal lipids*, *Biochem. Biophys. Acta* **620**, 281-296, 1980) a termické poškození tkáně (K. H. Schmidt a další, *Studies on the structure and biological effects of pyrotoxins purified from burned skin*, *World J. Surg.* **3**, 361-365, 1979). Předpokládá se proto, že popáleniny vedou k oxidativnímu poškození struktury buněk.

Byly proto zkoumány autooxidativní změny lipidů membrány jako důsledek autointoxikace po těžkých popáleninách. Byly zkoumány zejména změny ve složení mastných kyselin lipidů mem-brány. Dále bylo zkoumáno, do jaké míry ovlivňují deriváty silibininu vyráběné postupem podle vynálezu změny ve složení mastných kyselin lipidů membrány.

Změny ve složení mastných kyselin lipidů membrány po těžkých popáleninách:

Samčí exempláře krys (Wistar) s průměrnou hmotností 360 g se chovají ve třech skupinách s volným přístupem k vodě a suché potravě. Až do začátku pokusu činila teplota místnosti 22 °C, po zahájení pokusu byla zvířata udržována při teplotě 30 °C. K vyvolání popálenin kůže bylo použito měděného razidla o ploše 20 cm² při konstantním tlaku a při teplotě 250 °C. Aby se vyloučilo tepelné poškození níže ležících orgánů, natáhne se kůže přes vzduchem chlazenou dutou špachtli. Při tomto uspořádání pokusu bylo možno dosáhnout velmi exaktních úrazů popá-lením, které skýtal konstantní poměry doby přežití.

Na začátku pokusu byla zvířata narkotizována pomocí 50 mg/kg nembutalu. Po poranění po-páleninou byla zvířatům k profylaxi šoku podána intraperitoneálně injekce 20 ml Ringerova roz-toku laktátu.

Bylo vytvořeno 5 pokusných skupin:

- | | |
|-----------------------------------|---|
| a) normální skupina: | zcela netknutá zvířata |
| b) kontrolní skupina I: | zvířata ošetřená pouze silibininem po dobu 6 dnů za použití 75,5 mg dvojsodné soli silibinin-C-2',3-di-hydrogensukcinátu |
| c) kontrolní skupina II: | zvířata se simulovaným operačním zákrokem |
| d) skupina zvířat s popáleninami: | 25 %, 250 °C, 20 s, 0,05 MPa |
| e) testovaná skupina: | zvířata, kterým bylo i.p. aplikováno 75,5 mg dvojsodné soli silibinin-C-2',3-dihydrogensukcinátu po dobu 6 dnů, počínaje dnem před popálením. |

Za účelem izolace mikrosomů byla zvířata na konci pokusné periody pod narkózou vykrváčena. Potom byla zvířatům odebrána játra, zvážena a ihned přenesena do ledem ochlazeného izolačního média (0,25 mmol sacharózy, 1 mmol ethylendiamintetraoctové kyseliny, 10 mmol tris-pufu . Hcl, ph 7,2). Játra se rozřežou a homogenizují se v uvedeném prostředí. Diferenciálním odstředěním se peletizuje frakce mikrosomů. Mikrosomy se znovu suspendují a znovu se odstředí. Potom se připraví suspenze, u které 1 ml suspenze odpovídá 1 g jaterní tkáně.

Lipidy se určí metodou, kterou popsal J. Folch (A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, J. Biol. Chem. 226, 497-508 (1957), modifikací, kterou popsali Bligh a Dyer (A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917 (1959)).

Extrahované lipidy mikrosomů se zmýdelní hydroxidem sodným. Volné mastné kyseliny se esterifikují přidáním směsi fluoridu boritého a methanolu. Po odpaření methanolu a po odstranění hydrofilních vedlejších produktů se kvantitativně určí estery mastné kyseliny.

U skupin nepopálených zvířat nebylo možno zjistit žádnou pozoruhodnou změnu vzorků mastné kyseliny. Narkóza a nepatrný operativní zásah nevedly proto ke změně mikrosomálních lipidů. Z tohoto důvodu byla pro další srovnávání spojena normální skupina a kontrolní skupina na jedinou kontrolní skupinu.

Srovnání zvířat bez popálenin a s popáleninami, pokud jde o jejich mikrosomální vzorek mastných kyselin, ukazuje na posuny nenasycených mastných kyselin směrem k nasyceným mastným kyselinám.

Rozdělení mastných kyselin v mikrosomálních jaterních lipidech a změny způsobené tepelným poškozením kůže je znázorněno na obr. 1.

Z obr. 1 je patrné, že podíl palmitové kyseliny (C16) stoupá po popálenině z 25,1 % na 34,4 % z celkového podílu mastných kyselin. U kyseliny stearové (C18) činí podíl u zvířat s popáleninami 46,3 %, což je o 13,2 % vyšší hodnota, než ta, která byla získána u kontrolních zvířat. U kyseliny olejové (C18:1) je prokazatelný mírný, nikoli však významný pokles. Podíl linolové kyseliny (C18:2) se po popálenině snížil asi na 1/3 původní hodnoty. U arachidonové kyseliny (C20:4) bylo konečně zjištěno, že po popálenině je přítomno pouze 31 % z její výchozí hodnoty. Sloupce označené písmenem K vyjadřují hodnoty pro kontrolní zvířata, zatímco sloupce označené písmenem P vyjadřují hodnoty pro popálená zvířata.

TABULKA 1

Vzorek mastných kyselin mikrosomálních lipidů z jater krys po ošetření dvojsodnou solí silibinin-C-2',3-dihydrogensukcinátu (Sili-suc-na) u zvířat s popáleninami a bez popálenin					
	C16	C18	C18:1	C18:2	C20:4
zvířata bez popálenin	29,8 %	37,2 %	8,9 %	9,6 %	16,2 %
(kontrolní skupina I)	± 6,2	± 12,3	± 1,1	± 3,3	± 4,9
zvířata s popáleninou	25,4 %	37,5 %	7,8 %	11,4 %	18,0 %
	± 6,0	± 8,6	± 1,0	± 5,3	± 9,1

Ze shora uvedených hodnot je patrné, že ošetření derivátem silibininu připraveným postupem podle vynálezu nezpůsobuje u kontrolních zvířat bez popálenin žádné podstatné změny ve srovnání s neošetřenými zvířaty. U zvířat s popáleninami vede ošetření k úplnému potlačení ztráty nenasycených mastných kyselin.

Souhrnně bylo možno zjistit následující skutečnosti:

Popáleniny vedou ke změnám ve vzorku mastných kyselin mikrosomálních lipidů. Předpokládá se, že tato skutečnost má za následek oxidační poškození membrán. To se ukazuje zejména ve značném poklesu vícenásobně nenasycených mastných kyselin.

Deriváty silibininu, připravované postupem podle tohoto vynálezu, jsou nyní schopny inhibovat oxidační poškození buněk. Uvedené sloučeniny jsou proto zvláště vhodné k narušení mechanismu oxidačního poškození po těžkých popáleninách.

Jak již bylo uvedeno, předpokládá se, že autotoxické reakce po těžkých popáleninách vedou zejména k oxidačnímu poškození buněk. Bylo proto dále zkoumáno, jak se projevuje standardizované tepelné poranění na PHA-indukovanou blastogenesi T-lymfocytů ze sleziny a z periferní krve krys. Dále potom bylo zkoumáno, jakým způsobem ovlivňují deriváty silibininu vyráběné podle tohoto vynálezu takovéto lymfocytární funkční poruchy po těžkých popáleninách.

Účinek standardizovaného tepelného poranění na PHA-indukovanou blastogenesi T-lymfocytů ze sleziny a z periferní krve krys.

Jak již bylo dříve popsáno, způsobí se na kůži na zádech krys (Wistar) popálenina pomocí měděného razidla. Jako kontrolní skupina sloužila simulovaně popálená zvířata, u kterých byly všechny operační zákroky provedeny bez popálenin. Po 2, 4, 7 a 9 dnech byla zvířatům s popáleninami popřípadě kontrolním zvířatům v etherové narkóze odebrána krev a slezina.

Heparinizovaná krev byla za účelem izolace lymfocytů přenesena na roztok Ficoll-Hypaque (hustota 1,077). Potom se směs odstředí a u získaných lymfocytů se zjišťuje pomocí trypanové modři jejich životnost. Za účelem izolace lymfocytů ze sleziny se orgán rozetře, protlačí se sítkem a zbaví doprovodných erytrocytů (pomocí roztoku "Lyse" podle Gaye).

Potom se směs buněk inkubuje po dobu 30 minut v nádobě v přítomnosti 5 % plodového telecího séra inaktivovaného teplem, aby se snížil podíl mononukleárních buněk v suspenzi adhezí na stěnu nádoby (5 %). Za účelem kultivace se buňky přenesou na ploché mikrotitrační desky. Potom se přidá 20 % plodového telecího séra. Tímto způsobem se určí spontánní blastogeneze měřením vestavěného ³H-thymidinu (2Ci/mmol) do buněk DNA.

Při předběžných pokusech bylo zjištěno, že optimální stimulace mitogenu se pohybuje při koncentraci PHA (mitogen-phythaemagglutin) 5 $\mu\text{mg/ml}$. Při těchto pokusech za účelem optimalizace celulárního testovacího systému bylo dále zjištěno, že k maximální stimulaci nové syntézy DNA dochází po 72 hodinách. Dále bylo zjištěno, že k dosažení nejvyšší stimulace se optimální koncentrace plodového telecího séra pohybuje kolem 20 %.

Jak bylo shora popsáno, určuje se spontánní blastogenese měřením vestavěného ^3H -thymidinu do DNA buněk. Buňky byly odebrány 18 hodin po přidání ^3H -thymidinu, přičemž se nullový bod pro 18 hodin shoduje s časovým okamžikem maximální stimulace.

Za účelem zkoumání účinku derivátů silibininu vyrobených postupem podle vynálezu byla ošetřena skupina krys derivátem silibininu. Za tímto účelem bylo intraperitoneálně injekčně aplikováno jedenkrát denně 75,5 mg dvojsodné soli silibinin-C-2',3-dihydrogensukcinátu. Tato terapie byla prováděna ode dne způsobení popáleniny až do dne odebrání orgánu (nejvýše až do 9. dne).

Za účelem vyhodnocení výsledků dosažených u kontrolních zvířat a u zvířat bez popálenin a u zvířat ošetřených pomocí dvojsodné soli silibinin-C-2',3-dihydrogensukcinátu byl vypočten stimulační index. Tato číselná hodnota představuje kvocient střední hodnoty stimulovaného vzorku a střední hodnoty kontrolního vzorku. Z takto získaného stimulačního indexu (SI) se vypočítá u každého pokusného zvířete střední stimulační index pro skupinu zvířat. Získané výsledky jsou vyjádřeny tímto indexem SI.

Vliv ošetření dvojsodnou solí silibinin-C-2',3-dihydrogensukcinátu na blastogenesi lymfocytů je znázorněn na obr. 2. Přitom obr. 2a znázorňuje stimulační index blastogenese krevních lymfocytů, zatímco obr. 2b znázorňuje stimulační index blastogenese lymfocytů ze sleziny. Hodnoty dosažené při ošetření dvojsodnou solí silibinin-C-2',3-dihydrogensukcinátu jsou označeny písmenem A, zatímco hodnoty dosažené bez tohoto ošetření jsou označeny písmenem B. Jak na obr. 2a, tak i na obr. 2b je na ose y vynesena index SI, zatímco na ose x jsou údaje počtu dnů.

U zvířat s popáleninami se snížená stimulovatelnost buněk v důsledku ošetření silibininem značně zvýší.

Již druhého dne vykazovala zvířata, která byla ošetřena dvojsodnou solí silibinin-C-2',3-dihydrogensukcinátu zhruba desetkrát vyšší citlivost krevních lymfocytů vůči PHA. 4. den po poranění popálením činila hodnota stimulačního indexu u krevních lymfocytů pro ošetřená zvířata 8, zatímco odpovídající hodnota pro neošetřená zvířata činila 1,5.

U buněk izolovaných ze sleziny leží stimulační indexy popálených, neošetřených zvířat ve všech případech zřetelně pod hodnotou 1. Aplikace silibininu vede k výraznému zlepšení ve všech zkoumaných dnech, přičemž se maxima dosahuje 7. dne po poranění popálením.

Dále byly prováděny ještě také srovnávací pokusy, které ukazují, že ošetření dvojsodnou solí silibinin-C-2',3-dihydrogensukcinátu samotnou nevede u zdravých zvířat k žádným významným změnám ve stimulovatelnosti blastogenese T-lymfocytů ze sleziny a z periferní krve, přičemž tato blastogenese byla indukována PHA.

Proto tedy stimuluje silibinin vyráběný postupem podle vynálezu blastogenesi lymfocytů zvířat s popáleninami významným způsobem.

Dále bylo zjištěno, že u zvířat, která byla ošetřena deriváty silibininu, byla obecná katabolie nižší, protože zvířata po tepelném úrazu začala rychle znovu přibývat na hmotnosti.

Otravy houbami:

Otravy muchomůrkou hliznatou počítáme k nejtěžším, které se v medicíně vyskytují. I když pouze 10 až 30 % otrav houbami je způsobováno muchomůrkou hliznatou, patří otrava touto houbou vzhledem k její nebezpečnosti již dávno k předmětům nejvyššího lékařského zájmu.

Ve starších publikacích se udává úmrtnost 30 až 50 %. Díky moderní intenzivní medicíně snížila se úmrtnost podle souborné studie, kterou vypracoval FLOERSHEIM a další, na základě sledování 205 pacientů průměrně na 22,4 %.

Jed muchomůrky hliznaté amanitin, může být pro dospělé pacienty smrtelný již v dávce 7 mg. Toto množství jedu je obsaženo v asi 50 g čerstvého exempláře.

Po řadě úspěšných pokusů na zvířatech byla účinná látka, tj. dvojsodná sůl silibinin-C-2',3-dihydrogensukcinátu, aplikována při terapii otravy muchomůrkou hliznatou.

Bylo ošetřeno 28 pacientů s otravami muchomůrkou hliznatou vedle obvyklých terapeutických zákroků navíc dvojsodnou solí silibinin-C-2',3-dihydrogensukcinátu. Z těchto 28 pacientů zemřel pouze jeden, který pozřel větší množství jedovaté houby v sebevražedném úmyslu. Tento výsledek demonstruje enormní terapeutický pokrok na tomto poli.

Výroba silibininu prostého isosilybinu:

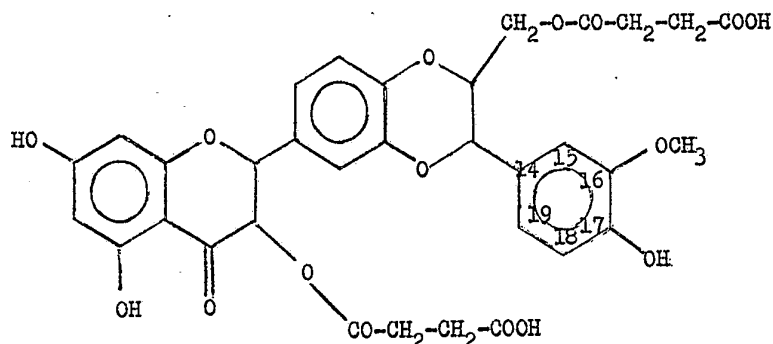
Suspenze 500 g produktu, podle DE-AS 19 23 082, sloupec 8, řádky 14 až 19, s obsahem silymarinu asi 70 % při poměru isomerů silybin : silidianin : silikristin zhruba 3 : 1 : 1, přičemž silybin obsahuje asi 1/3 isosilybinu, a 2 kg methanolu, tj. asi 2,53 litru se zahřívá za míchání po dobu 15 minut k varu. Z takto získaného roztoku lze po tomto čase již vysrážet nějaké množství silibininu. Potom se ve vakuu oddestiluje 0,75 až 1,25 kg, tj. asi 0,96 až 1,58 litru methanolu, a zbytek se ponechá při teplotě místnosti v klidu po dobu 10 až 28 dnů. Vyloučený silibinin se odfiltruje a promyje se dvakrát vždy 50 ml studeného methanolu. Po vysušení při teplotě 40 °C ve vakuu se izolovaný surový silibinin dále čistí následujícím způsobem:

60 g surového silibininu se za zahřívání rozpustí ve 3 litrech technického ethylacetátu. Potom se k získanému roztoku přidá 20 g aktivního uhlí a směs se míchá další 2 hodiny za zahřívání k varu pod zpětným chladičem. Potom se směs zfiltruje za vzniku čirého roztoku a tento roztok se potom při teplotě 50 °C zahustí za sníženého tlaku na obsah asi 250 ml. Tento koncentrát se potom během 15 minut rozmíchá za použití míchadla "Ultra-Turrax" a za míchání se přidá 25 ml methanolu. Potom se směs ponechá v klidu při teplotě místnosti. Před odfiltrováním silybinu, který se přitom vyloučil, se směs znovu míchá ještě 5 minut pomocí míchadla shora uvedeného typu. Vyloučená sraženina se dvakrát znovu promyje 50 ml ethylacetátu a vysuší se ve vakuové sušárně při teplotě 40 °C. Potom se produkt rozemele a za stejných podmínek se suší dále po dobu 48 hodin.

Postup podle vynálezu blíže ilustrují následující příklady, které však rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje.

P ř í k l a d 1

Příprava silibinin-C-2',3-dihydrogensukcinátu



50 g silibininu se rozpustí při teplotě 45 °C v 70 ml pyridinu, přidá se 50 g anhydridu jantarové kyseliny, reakční směs se míchá asi 8 hodin při teplotě 45 °C, přidá se 30 ml ethanolu a směs se míchá až do vzniku homogenní směsi. Potom se za intenzivního míchání přidá za účelem zmýdelnění fenylesterů během asi 30 minut 60 ml vody. Asi po jedné hodině míchání při teplotě 30 °C jsou fenylestery kvantitativně zhydrolyzovány. Úplnost hydrolyzy se přezkouší vysoce účinnou kapalinovou chromatografií. Hydrolyza se zastaví, jakmile se k takto získané reakční směsi rychle přidá 1,7 litru ethylacetátu.

Za účelem oddělení nadbytečné jantarové kyseliny a pyridinu se reakční roztok zředěný ethylacetátem dvakrát extrahuje vždy 5 litry vody, která je nasycena ethylacetátem a má hodnotu pH 1,85 (upravenou zředěnou vodnou chlorovodíkovou kyselinou). Extrakce se provádí jako protiproudá, tzn., že se okyselená promývací voda nasycená ethylacetátem čerpá proti proudu zředěného reakčního roztoku a potom se přidáváním zředěné chlorovodíkové kyseliny udržuje hodnota pH na 1,85 tak dlouho, až tato hodnota pH zůstane konstantní.

Potom se ethylacetátová fáze extrahuje v protiproudu za účelem vymytí nadbytečné chlorovodíkové kyseliny dvakrát vždy 3,4 litru vody, která je nasycena ethylacetátem. Jakmile je hodnota pH promývací vody vyšší než 4,5, oddělí se kvantitativně organická fáze, zahustí se při teplotě 40 až 50 °C ve vakuu na 1/12 výchozího objemu (asi 0,2 litru) a zředí se 125 ml ethanolu.

Sloučenina uvedená v názvu se získá přesrážením ze směsi ethanolu a vody a vysušením při teplotě 50 °C ve vakuu během 15 hodin.

K přípravě vzorku pro analýzu se sloučenina uvedená v názvu třikrát přesráží ze směsi ethanolu a vody a potom se vysuší během 15 hodin při teplotě 50 °C ve vakuu.

Při hmotové spektrometrii (desorpce polem) se jeví molekulový pík na očekávané hodnotě molekulové hmotnosti 682.

IČ spektrum vykazuje v oblasti valenční frekvence karbonylové skupiny dva překrývající se pásy, přičemž jeden, stejně jako v případě silibininu, přísluší karbonylové funkci pyronového kruhu při vlnové délce 1 635 cm^{-1} . Druhý pás leží při 1 730 cm^{-1} a pochází od obou esterkarbonylových funkcí.

^1H -NMR spektrum potvrzuje, že v daném případě došlo ke dvojnásobné esterifikaci. Tak činí integrací zjištěný poměr aromatických protonů ku methylenovým protonům zbytků jantarové kyseliny 8 : 8 (rozsah ppm 5,9 až 7,1). Poměr těchto methylenových protonů (ppm 2,6) ku methylovým protonům methoxyskupiny (ppm 3,8) činí 8 : 3 a proto s ním souhlasí.

Také chemické posuny při zkoumání ^{13}C ukazují, že esterifikace proběhla na obou alkoholických hydroxylových skupinách, vzhledem k tomu, že chemické posuny se mění nejintenzivněji na atomu C_{11} a na přilehlých atomech uhlíku C_{12} až C_{14} , jakož i na C_2 až C_4 .

Elementární analýza:

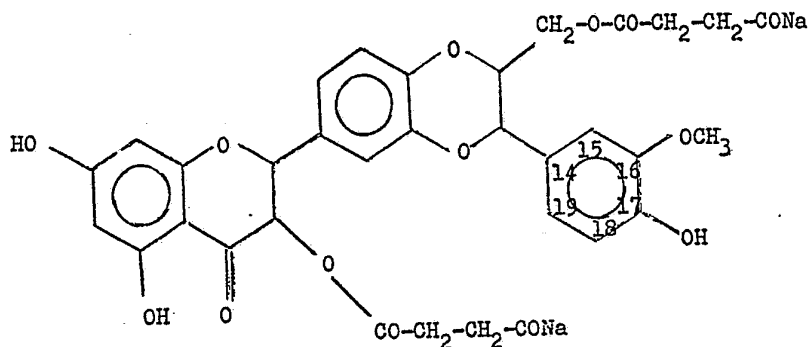
pro $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ (molekulová hmotnost 682,60)

vypočteno 58,07 % C, 4,43 % H, 37,50 % O;

nalezeno 58,05 % C, 4,57 % H, 37,31 % O.

P ř í k l a d 2

Dvojsodná sůl silibinin-C-2',3-dihydrogensukcinátu



K roztoku v ethanolu, který byl získán podle příkladu 1, se za míchání a za chlazení z vnější strany reakční nádoby přikape při teplotě -5 až 9°C 6% ethanolický roztok hydroxidu sodného v množství stanoveném na základě zjištění obsahu pevné látky v tomto roztoku, suspenze se míchá další hodinu při teplotě místnosti, vyloučená béžová pevná látka se odfiltruje, dvakrát se suspenduje vždy po dobu 5 až 10 minut pomocí míchadla Turrax ve 150 ml ethanolu a znovu se odfiltruje. Za účelem odstranění zbylého ethylacetátu se potom produkt suspenduje 14 hodin při teplotě místnosti ve 280 ml ethanolu, suspenze se znovu zfiltruje, zbytek na filtru se promyje 70 ml ethanolu a vysuší se během 15 hodin při teplotě 40 až 45°C ve vakuové sušárně. Takto předsušený produkt se potom rozele, pomocí síta se proseje tak, aby velikost částic byla menší než $0,2\text{ mm}$ a suší se dalších 48 hodin při teplotě 40 až 45°C ve vakuu. Takto se získá 52 g sloučeniny uvedené v názvu (výtěžek 69 %).

Sloučenina uvedená v názvu nemá ostrou teplotu tání. Tato látka začíná jihnout při teplotě asi 80°C a taje za uvolňování bublin při teplotě asi 100°C .

UV spektrum v methanolu vykazuje následující hodnoty:

$$\lambda_{\text{max}} = 288\text{ nm}, \quad \epsilon = 1,73 \cdot 10^4.$$

Molekulová hmotnost sloučeniny uvedené v názvu činí 726,56. Uvedená sloučenina je představována slabě béžovým mikrokrystallickým práškem, bez specifického zápachu a s chutí podobnou chuti soli. Tato látka je ve vodě snadno rozpustná, v ethanolu se rozpouští obtížně a v acetonu, etheru a chloroformu je prakticky nerozpustná.

Příklad ilustrující aplikaci výrobních sloučenin:

Výroba lyofilizátu určeného pro i.p. aplikaci:

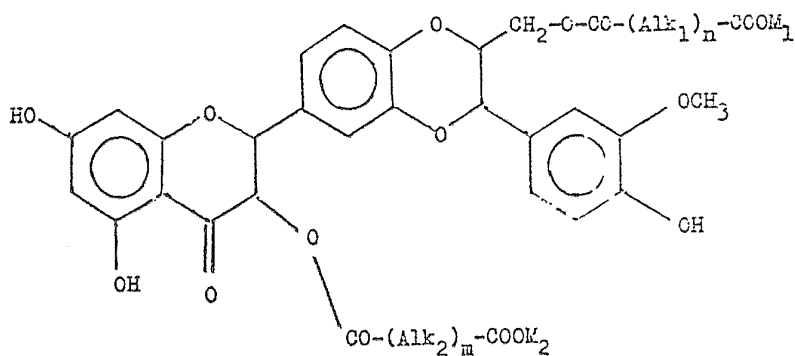
dvojsodná sůl silibinin-C-2',3-dihydrogensukcinátu	75,0 mg
mannitol	10,0 mg
voda pro injekční účely	do 1,5 ml

1,5 ml roztoku se naplní do ampulí o obsahu 5 ml a potom se roztok známým způsobem vysuší vymrazením. Ampule s hotovým lyofilizátem se za účelem uchovávání uzavře obvyklým způsobem.

Při použití se lyofilizát rozpustí v 5 ml sterilního fyziologického roztoku chloridu sodného na čirý roztok.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby nových derivátů silibininu obecného vzorce I



(I)

ve kterém

n a m

znamenají vždy nezávisle na sobě číslo 0 nebo 1,

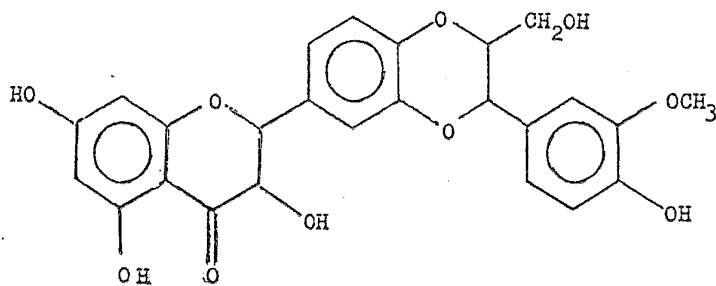
Alk₁ a Alk₂

znamenají nezávisle na sobě alkylenovou skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku nebo alkenylenovou skupinu se 2 až 4 atomy uhlíku a

M₁ a M₂

znamenají nezávisle na sobě atom vodíku nebo atom alkalického kovu,

vyznačující se tím, že se 1 díl hmotnostní silibininu vzorce A



(A)

rozpustí v 1 až 2 dílech hmot. pyridinu a za míchání se nechá reagovat s 1 až 3 díly hmotnostními anhydridu dikarboxylové kyseliny obecného vzorce II

ve kterém

Alk znamená skupinu Alk_1 nebo Alk_2 definovanou shora,

potom se přidá ethanol až do vzniku homogenní směsi, potom se za intenzivního míchání pomalu přidává voda, přičemž se hydrolyzují přítomné estery aromaticky vázaných hydroxylových skupin; jakmile je tato hydrolýza ukončena, zředí se reakční směs ethylacetátem, promývá se kyselou vodou nasycenou ethylacetátem, ethylacetátová fáze se zahustí, vyjme se ethanol a popřípadě působením alkoholického roztoku hydroxidu alkalického kovu se převede na sůl.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako výchozí látky použijí odpovídající sloučeniny vzorce A a obecného vzorce II, za vzniku sloučenin obecného vzorce I, ve kterém

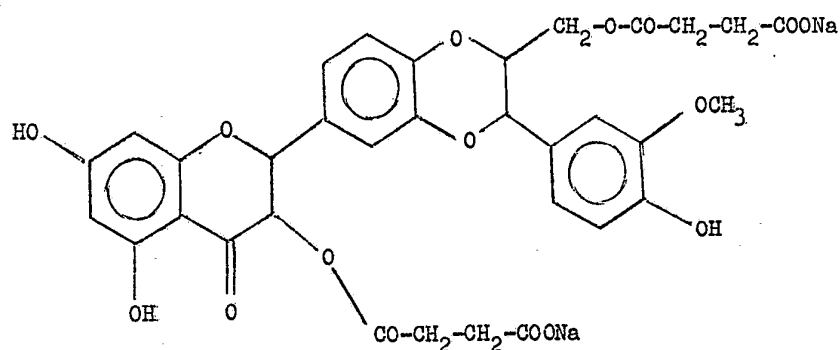
n a m znamenají nezávisle na sobě číslo 0 nebo 1,

Alk_1 a Alk_2 znamenají alkylenovou skupinu se 2 atomy uhlíku a

M_1 a M_2 znamenají nezávisle na sobě atom alkalického kovu.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako výchozí látky použijí odpovídající sloučeniny vzorce A a obecného vzorce II, za vzniku sloučenin obecného vzorce I, ve kterém n a m , Alk_1 a Alk_2 , jakož i M_1 a M_2 mají vždy stejné významy.

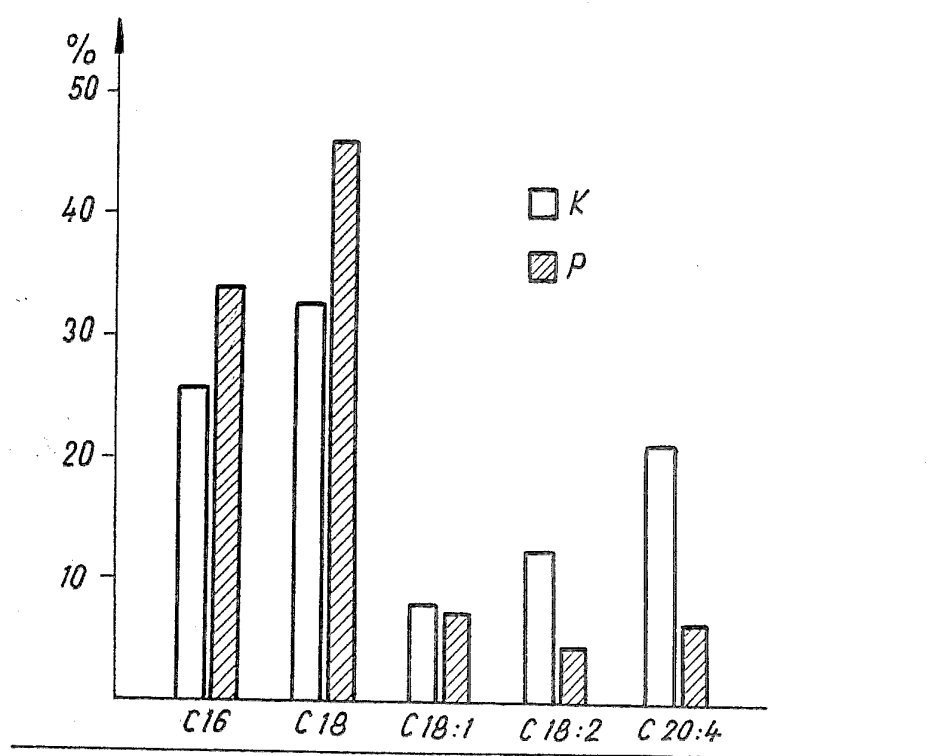
4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako výchozí látky použijí odpovídající sloučeniny vzorce A a obecného vzorce II, za vzniku dvojsodné soli silibinin-C-2',3-di-hydrogensukcinátu vzorce



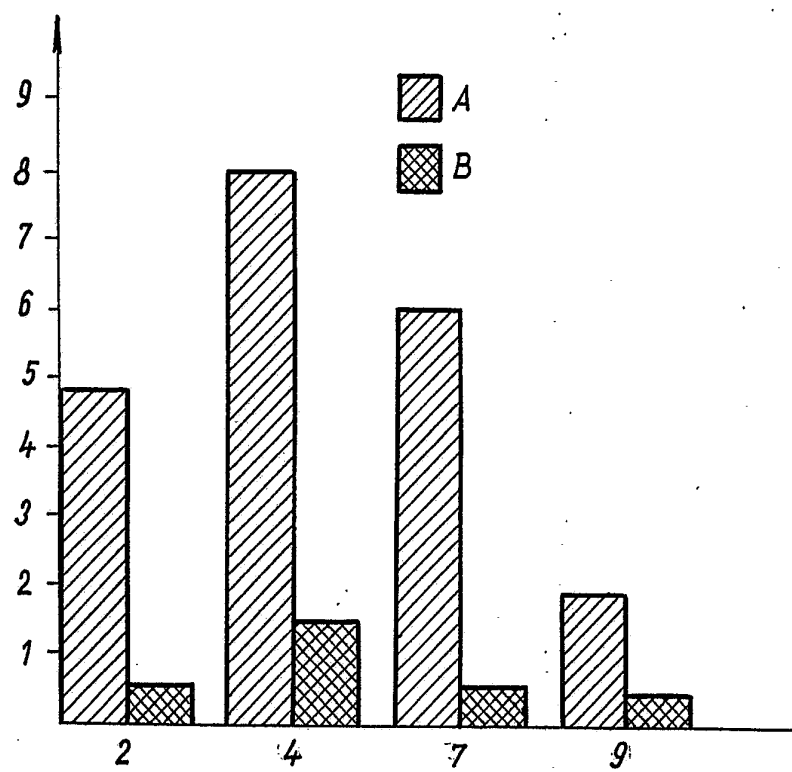
5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se reakce s anhydridem dikarboxylové kyseliny provádí při teplotě 40 až 50 °C.

6. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se hodnota pH kyselé promývací vody nasycené ethylacetátem udržuje v rozsahu 1,5 až 2,4.

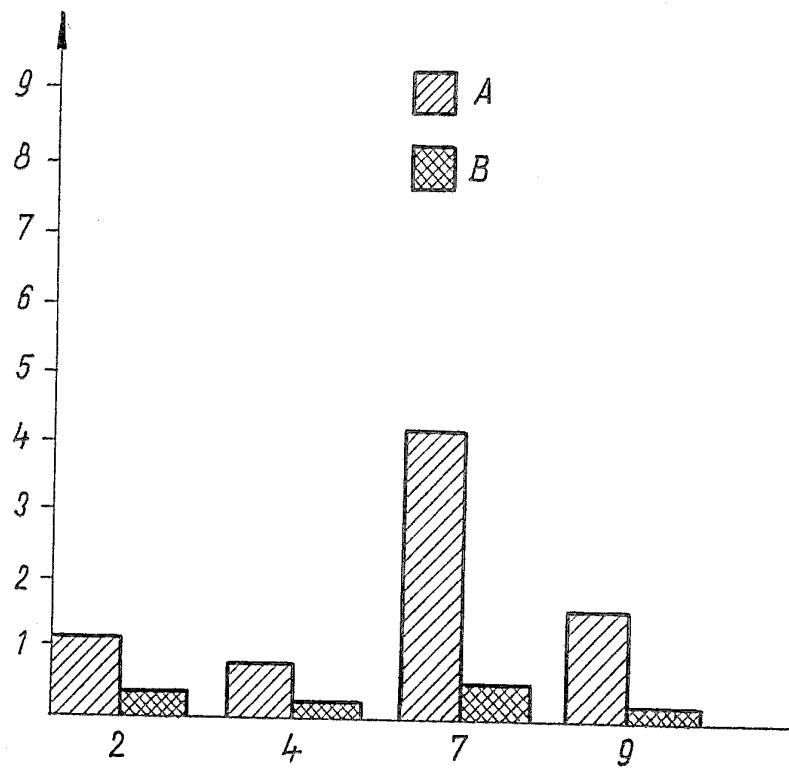
3 výkresy



OBR. 1



OBR. 2a



OBR. 2b