(19) DANMARK

(12) **PATENTSKRIFT** (11) **169385 B1**

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: **4340/85**

(22) Indleveringsdag: **25 sep 1985**

(41) Alm. tilgængelig: **27 mar 1986**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **17 okt 1994**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **26 sep 1984 GB 8424269**

(51) Int.Cl.5 **C 07 D 493/04**
**//(C 07 D 493/04,**
**C 07 D 307:00,**
**C 07 D 317:00)**

(73) Patenthaver: ***PHARMA-MEDICA- A-S; Vesterlundevej 15-19; 2730 Herlev, DK**

(72) Opfinder: **Ole *Buchardt; DK**

(74) Fuldmægtig: **Internationalt Patent-Bureau**

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af renset podophyllotoxin**

(56) Fremdragne publikationer

---

(57) Sammendrag:

4340-85

En fremgangsmåde til fremstilling af renset podophyllotoxin ud fra en opløsning deraf, bestående i at der dannes et fast kompleks af podophyllotoxin og en aromatisk eller heteroaromatisk forbindelse forskellig fra benzen, og det faste kompleks skilles fra opløsningen. Yderligere rensning kan opnås ved ekstraktion af en opløsning af podophyllotoxinet i et med vand ikke-blandbart opløsningsmiddel med en vandig base.
Fremgangsmåden er velegnet til rensning af podophyllotoxin i store mængder, undgår anvendelse af det carcinogene opløsningsmiddel benzen og giver et højt udbytte af rent podophyllotoxin.

DK 169385 B1

Opfindelsen angår en særlig fremgangsmåde til isolering og rensning af podophyllotoxin fra relativt urene kilder for dette, navnlig planteekstrakter, for eksempel harpikser vundet ved ekstraktion fra planter af slægten podophyllum.

Podophyllotoxin er et meget biologisk aktivt stof, der er særligt anvendeligt som lægemiddel over for condylmata acuminata (veneriske vorter) [G.Gabriel og R.N.T. Thin, Br.J.Vener.Dis., 59, 124-126 (1983)], ligesom det har cytostatiske egenskaber [G. von Krogh og H.I. Maibach, Dermatologica, 167, 70-77 (1983)] og antivirale egenskaber [T.Markkanen, M.L.Makinen, J.Miettinen, E.Maunuksela, T.Laijoki og J. Paranko, Drugs Exp.Clin.Res. 9, 1-7 (1983)].

Tidligere er podophyllotoxin blevet isoleret fra ovennævnte harpikser ved forskellige besværlige metoder, der alle har omfattet opløsningsmiddel-ekstraktion, som regel med chloroform, efterfulgt af yderligere oparbejdningstrin. Ifølge den mest autoritative nyere litteratur [W.M.Hearson og W.S.MacGregor, Chem.Rev., 55, 1002 (1955), J.L. Hartwell og W.E. Detty, J.Am. Chem.Soc., 246-253 (1950)] har chromatografisk rensning været nødvendig til udvinding af podophyllotoxin. I mange tilfælde har der været anvendt benzen under rensningsprocesserne, uanset de dermed forbudne sundhedsmæssige farer. Endvidere har chromatografi været betragtet som absolut afgørende for at vinde podophyllotoxin i en sådan renhedsgrad, at det kun er svagt forurenet med de mange stoffer af beslægtet art, som findes i plantematerialet. Dette har resulteret i , at rent podophyllotoxin er et sjældent og kostbart stof, der er vanskeligt at skaffe i store mængder.

Behovet for rent podophyllotoxin er nyligt steget, både som råmateriale for omdannelse til forskellige farmakologisk aktive derivater og til anvendelse i sig selv ved kliniske behandlinger. I begge tilfælde er det meget ønskeligt at anvende et så rent produkt som muligt.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af renset podophyllotoxin over en 2-trins krystallisation af komplekser af podophyllotoxin og spaltning af komplekserne til renset podophyllotoxin, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at

(1) en opløsning af urent podophyllotoxin i en lavere alkohol, lavere alkylacetat eller acetone og eventuelt vand i tilstrækkelig mængde til kompleksdannelsen med podophyllotoxinet som kompleksdanner tilsættes toluen, o-, m-, eller p-xylen, anisol, chlorbenzen, anilin, pyridin, phenol, nitrobenzen eller benzylalkohol, hvorved der dannes et kompleks med kompleksdanneren og eventuelt vand og som fraskilles ved krystallisation,

(2) det fraskilte kompleks opløses i den samme eller en anden opløsningsmiddel-komponent end den, som blev anvendt i det foregående trin, hvorefter opløsningen tilsættes den samme eller en anden kompleksdanner end den, som er angivet i (1) og eventuelt vand i tilstrækkelig mængde til kompleksdannelsen,hvorefter det dannede kompleks fraskilles ved krystallisation, og

(3) komplekserne fra det foregående trin renses ved vaskning og/eller omkrystallisation på i og for sig kendt måde under samtidig omdannelse af komplekserne til et renset podophyllotoxinprodukt, eventuelt efterfulgt af en yderligere rensningsbehandling enten ved ekstraktion af en opløsning af det rensede produkt med en NaOH-opløsning eller i kombination med behandling med vandigt NaOH og/eller saltsyre og/eller vand og/eller vandigt natriumchlorid, og isolering af det yderligere rensede podophyllotoxinprodukt.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er velegnet til rensning af podophyllotoxin i store mængder, den undgår det stærkt carcinogene opløsningsmiddel benzen, og den giver et meget højt udbytte af rent podophyllotoxin. Endvidere undgår fremgangsmåden behovet for at rense den rå

harpiks ved opløsningsmiddel-ekstraktion.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er baseret på den hidtil ukendte evne hos podophyllotoxin til at danne komplekser med mange forskellige aromatiske og heteroaromatiske forbindelser, omfattende phenol, toluen, chlorbenzen, anisol, o-, m- og p-xylener og nitrobenzen, og basiske stoffer, såsom anilin og pyridin.

De nøjagtige betingelser for gennemførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ikke kritiske og kan varieres i vid udstrækning, men det generelle princip består i at opløse urent podophyllotoxin, for eksempel podophyllum-harpiks, i et af de nævnte opløsningsmidler, fortrinsvis en aliphatisk ($C_1$-$C_3$)alkohol eller en ($C_1$-$C_3$)alkyl-eddikesyreester. Til opløsningen sættes derefter den kompleksdannede aromatiske forbindelse, og dette kan, om nødvendigt, efterfølges af forskellige mængder vand. Dette medfører udfældning af almindeligvis velkrystallinske komplekser, der kan isoleres, og som efter fjernelse af det kompleksdannende middel kan give ca. 90% rent podophyllotoxin i højt udbytte. Ved at gentage den proces med det samme eller et forskelligt kompleksdannende middel kan der vindes 92-95% rent podophyllotoxin. Det har ofte vist sig, at adskillige af stofferne af lignende art som podophyllotoxin forbliver som vedholdende urenheder selv efter 5-8-omkrystalllisationer under anvendelse af forskellige opløsningsmidler og kompleksdannende midler, og at der må anvendes et yderligere fremgangsmådetrin for at opnå en endnu højere renhedsgrad.

Ifølge en foretrukket udførelsesform for opfindelsen, der muliggør udvinding af podophyllotoxin med særlig høj renhed, kan der således gennemføres "absolut" rensning på en meget overraskende og uforudseelig måde, nemlig ved ekstraktion af en opløsning af det endnu noget urene podophyllotoxin i et med vand ikke-blandbart opløsningsmiddel, for eksempel chloroform, med vandig

base. Dette resultat er overraskende, fordi podophyllotoxin, ifølge litteraturen, er meget labilt under basiske betingelser, idet det omdannes til dets epimere, picropodophyllin, når det behandles med alkali [W. Borsche og J. Niemann, Liebigs Ann.Chem. 494, 126-142 (1932)].

Opfindelsen beskrives nærmere gennem følgende eksempler.

Eksempel 1

A. Podophyllin (643 g) blev opløst i ethanol (1,5 liter) under svag opvarmning. Til den varme opløsning blev der sat toluen (643 ml) efterfulgt af vand (129 ml). Opløsningen blev afkølet med isvand, og det udfældede krystallinske materiale blev isoleret ved filtrering og vasket med vand (2 liter).
Udbytte: 342,8 g

Dette materiale var et kompleks af podophyllotoxin, toluen og vand, og det fandtes ved HPLC at indholde ca. 13% beslægtede lignaner.

Komplekset blev opløst i ethanol (1,0 liter) under svag opvarmning, der blev tilsat pyridin (140 ml) efterfulgt af vand (470 ml), og opløsningen blev afkølet med isvand. Det udfældede krystallinske materiale blev frafiltreret og vasket med ether (250 ml).
Udbytte: 292 g.

Dette materiale bestod af et podophyllotoxin/-pyridin/vand-kompleks, der ifølge HPLC fandtes at indeholde ca. 7% af andre beslægtede lignaner. Materialet blev omkrystalliseret af ethanol (1,0 liter)/vand (430 ml), hvorved vandtes 239 g af pyridin/vand/komplekset.

B. Komplekset (119 g) blev opløst i chloroform (1,2 liter), der blev behandlet med: (i) 0,8N HCl (500 ml), (ii) 0,4N NaOH (500 ml), (iii) 0,01N NCl (450 ml), (iv) vand (450 ml) og (v) mættet vandigt natriumchlorid (500 ml).

Chloroformopløsningen blev tørret over fast magnesiumsulfat, chloroformen blev fjernet i vakuum, og det tilbageværende sirupsagtige materiale blev omkrystalliseret af ethylacetat (450 ml), hvorved vandtes podophyllotoxin,aq. (50 g). Dette materiale fandtes ved HPLC at indeholde $< 0,4\%$ af andre lignaner. En prøve blev underkastet tørring (100°C) i vakuum, hvorved vandtes analytisk rent podophyllotoxin. Analyse: Fundet (Beregnet): C: 63,62 (63,76), H: 5,39 (5,35).

Dets IR-, $^{1}$HNMR- og $^{13}$C NMR-spektre var identiske med spektrene registreret i litteraturen.

Eksempel 2

A. Podophyllin (1 kg) blev opløst i ethanol (3 liter) under svag opvarmning. Såsnart opløsningen var homogen, blev der tilsat toluen (1,0 liter) og vand (200 ml), og blandingen blev afkølet med isvand. Det udfældede krystallinske materiale blev frafiltreret og vasket med ether (1,0 liter). Det blev derefter omkrystalliseret i ethanol (2 liter), toluen (650 ml) og vand (130 ml). Det isolerede krystallinske materiale blev opløst i ethanol (1,5 liter), der blev tilsat pyridin (210 ml) og vand (630 ml), og opløsningen blev afkølet med isvand. Det udfældede krystallinske kompleks blev isoleret, vasket med ether (1,0 liter) og tørret, hvorved vandtes 478 g materiale.

B. Produktet fra A blev opløst i chloroform (5 liter) og behandlet med: (i) 0,4N HCl (2 liter), (ii) 0,2N NaOH (2 liter), (iii) 0,03N HCl (1,4 liter) og (iv) mættet vandigt natriumchlorid (700 ml) og (v) tørret over magnesiumsulfat. Chloroformen blev fjernet i vakuum, og det som inddampningsrest vundne sirupagtige materiale blev omkrystalliseret af ethanol/vand (1,4 liter/0,9 liter). Herved vandtes podophyllotoxin, $2H_2O$ (419 g, ~39%), der indeholdt $< 0,6\%$ picropodophyllin og $< 0,1\%$ af andre beslægtede lignaner.

Analyse: fundet (beregnet): C: 58,63 (58,67), H: 5,53 (5,77).

Identificeret ved IR- og $^1H$ NMR-spektroskopi. En lille prøve blev tørret (100°C) i vakuum, hvorved vandtes en analytisk ren prøve.

Analyse: C: 63,75 (63,76), H: 5,41 (5,35).

Eksempel 3

A. Podophyllin (500 g) blev opløst i ethanol (0,5 liter) under svag opvarmning, der blev tilsat toluen (0,5 liter) og vand (100 ml), opløsningen blev afkølet, og det udfældede krystallinske materiale blev frafiltreret og vasket med ethanol/toluen/vand (15:5:1, 200 ml). Dette blev straks opløst i ethanol (1,0 liter), toluen (330 ml) og vand (66 ml), og opløsningen blev afkølet med isvand. Det udfældede materiale blev isoleret som beskrevet ovenfor og tørret, hvorved vandtes 211 g. Dette materiale blev opløst i kogende methanol (500 ml), og den varme opløsning blev filtreret, der blev tilsat vand (368 ml), og opløsningen blev afkølet med isvand, hvorved der efter filtrering og tørring i vakuum over $H_2SO_4$ og ved almindeligt tryk ved 100°C vandtes 192 g podophyllotoxin og andre beslægtede lignaner i et forhold på 9:1.

B. Ovennævnte urene podophyllotoxin (5 g) blev opløst i chloroform (50 ml) og behandlet successivt med: (i) 0,4N NaOH (50 ml), (ii) 0,02N HCl (50 ml), (iii) vand (50 ml) og (iv) mættet natriumchlorid (50 ml), chloroformen blev fjernet i vakuum, og inddampningsresten blev omkrystalliseret af ethanol/vand (1:1, 20 ml). Herved vandtes podophyllotoxin,aq., identificeret ved IR-spektroskopi, og som indeholdt < 1,4% af andre lignaner.

Eksempel 4

A. Podopyllin (50 g) blev opløst i ethanol (150 ml) under opvarmning efterfulgt af tilsætning af chlorbenzen (50 ml) og vand (10 ml). Efter afkølingen blev bund-

faldet frafiltreret og vasket med ether (20 ml). Udbyttet af podophyllin/chlorbenzen/vand-kompleks: 19,5 g, der fandtes at indeholde ca. 13% af andre lignaner.

Det ovennævnte materiale (5 g) blev opløst i ethanol (15 ml), der blev tilsat phenol (5 g) og vand (2 ml), opløsningen blev afkølet, og bundfaldet blev frafiltreret og vasket med ether (10 ml). Udbyttet af podophylotoxin/phenol/vand-kompleks: 4,2 g.

B. Dette materiale blev opløst i ethylacetat (20 ml), og opløsningen blev behandlet med 2N NaOH (20 ml). Den organiske fase blev fraskilt og koncentreret i vakuum. Det resulterende materiale blev omkrystalliseret af ethanol/vand (1:1, 20 ml), hvorved der efter tørring i vakuum over $H_2SO_4$ vandtes 3,75 g af >98,5% rent podophyllotoxin,aq., bestemt ved HPLC og identificeret ved IR-, $^1H$ NMR- og $^{13}C$ NMR-spektroskopi, $[\alpha]_D^{20}$ = $-118,5^o$.

Det følgende eksempel illustrerer resultaterne opnået ved anvendelse af forskellige kombinationer af kompleksdannende midler.

Eksempel 5

Generel fremgangsmåde: Podophyllin blev opløst under svag opvarmning i det i tabel I angivne opløsningsmiddel. I nogle tilfælde var der en rest tilbage, og i så fald blev opløsningen fradekanteret. Dette efterfulgtes af tilsætning af et aromatisk kompleksdannende middel, efterfulgt af tilsætning af forskellige mængder vand. Efter afkøling blev det udfældede kompleks isoleret, og processen blev gentaget med samme eller andre opløsningsmidler og kompleksdannende midler. Det isolerede materiale blev derefter omkrystalliseret, og de kompleksdannende midler blev fjernet, og i hver enkelt tilfælde blev der identificeret ved IR-spektroskopi og/eller HPLC-analyse. Resultaterne er vist i Tabel I.

Tabel I

Isolation af podophyllotoxin fra podophyllin

| | Første krystallisation | | | | Anden krystallisation | | | Tredie krystallisation | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Podophyllotoxin renhed i % | Podophyllin g | Opløsningsmiddel ml | Kompleksdannende middel ml | Vand ml | Opløsningsmiddel ml | Kompleksdannende middel ml | Vand ml | Opløsningsmiddel ml | Kompleksdannende middel ml | Vand ml | Udbytte g |
| 90,5 | 10 | EtOH,30 | Toluen ,10 | 2 | EtOH,30 | Toluen ,6 | - | MeOH,17 | - | 14 | 5,5 |
| 91,4 | " | " | " | " | " | o-Xylen ,6 | - | " ,15 | - | 15 | 4,3 |
| 91,0 | " | " | " | " | " | m-Xylen ,6 | - | " ,16 | - | 11 | 4,7 |
| 92,3 | " | " | " | " | " | p-Xylen ,6 | - | " ,17 | - | 10 | 5,0 |
| 90,2 | " | " | " | " | " | Anisol ,6 | - | " | - | 10 | 5,0 |
| 91,7 | " | " | " | " | " | Chlorbenzen ,6 | - | " | - | 15 | 4,9 |
| 92,7 | 8,3 | EtOH,25 | o-Xylen ,10 | " | EtOH,25 | Toluen ,4.3 | 0,85 | " | - | 10 | 3,1 |
| 92,8 | " | " | " | " | " | o-Xylen ,4.3 | " | MeOH,12 | - | 10 | 3,1 |
| 93,8 | " | " | " | " | " | m-Xylen ,4.3 | " | MeOH,27 | - | 27 | 3,1 |
| n.d. | " | " | " | " | " | p-Xylen ,4.3 | " | MeOH,15 | - | 10 | 3,4 |
| 92,7 | " | " | " | " | " | Anisol ,4.3 | " | " | - | 10 | 3,3 |
| 92,5 | " | " | " | " | " | Chlorbenzen ,4.3 | " | " | - | 20 | 3,2 |
| 92,1 | 10 | EtOH,30 | m-Xylen ,10 | " | " | Toluen ,5 | 1.2 | " | - | 10 | 3,7 |
| 91,5 | " | " | " | " | " | o-Xylen ,6 | " | " | - | 11 | 3,5 |
| 92,3 | " | " | " | " | " | m-Xylen ,6 | " | MeOH,25 | - | 20 | 4,1 |
| 91,5 | " | " | " | " | " | p-Xylen ,6 | " | " | - | " | 4,1 |
| 92,7 | " | " | " | " | " | Anisol ,6 | " | " | - | " | 4,2 |
| 92,6 | " | " | " | " | " | Chlorbenzen ,6 | " | " | - | " | 3,8 |
| 91,8 | " | " | p-Xylen.,10 | " | EtOH,30 | Toluen ,5 | 1.0 | " | - | " | 4,5 |
| 91,5 | " | " | " | " | " | o-Xylen ,5 | " | " | - | " | 4,5 |
| 93,9 | " | " | " | " | " | m-Xylen ,5 | " | " | - | " | 4,7 |
| 92,6 | " | " | " | " | " | p-Xylen ,5 | " | " | - | " | 3,9 |
| 91,3 | " | " | " | " | " | Anisol ,5 | " | " | - | " | 4,7 |
| 91,9 | " | " | " | " | " | Chlorbenzen ,5 | " | " | - | " | 1,9 |
| 92,5 | " | " | Anisol.,10 | " | " | Toluen ,5 | " | " | - | " | 3,8 |
| 92,7 | " | " | " | " | " | o-Xylen ,5 | " | " | - | " | 3,4 |

(fortsætter)



DK 169385 B1

Tabel I (forsat)

| Podophyllotoxin renhed i % | Første krystallisation: Podophyllin g | Opløsningsmiddel ml | Kompleksdannende middel ml | Vand ml | Anden krystallisation: Opløsningsmiddel ml | Kompleksdannende middel ml | Vand ml | Tredie krystallisation: Opløsningsmiddel ml | Kompleksdannende middel ml | Vand ml | Udbytte g |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 94,9 | " | " | " | " | " | m-Xylen ,5 | " | " | - | " | 3,7 |
| 93,0 | " | " | " | " | " | p-Xylen ,5 | " | " | - | " | 3,7 |
| 92,3 | " | " | " | " | " | Anisol ,5 | " | " | - | " | 3,7 |
| 93,1 | " | " | " | " | " | Chlorbenzen ,5 | " | " | - | " | 3,9 |
| 90,7 | " | " | Chlorbenzen ,10 | " | " | Toluen ,5 | " | " | - | " | 2,7 |
| 92,8 | " | " | " | " | " | o-Xylen ,5 | " | " | - | " | 3,1 |
| 93,8 | " | " | " | " | " | p-Xylen ,5 | " | " | - | " | 2,7 |
| 92,1 | " | " | " | " | " | Anisol ,5 | " | " | - | " | 3,0 |
| 93,0 | " | " | " | " | " | Chlorbenzen ,5 | " | " | - | " | 2,6 |
| 93,2 | " | " | Toluen ,10 | " | - | - | - | $ClCH_2CH_2Cl$,25 | - | - | 3,3 |
| 94,5 | " | " | " | " | - | - | - | EtOAc,30 | - | - | 3,5 |
| 89,0 | " | " | " | " | - | - | - | 1-Hexanol,30 | - | - | 4,2 |
| 89,5 | " | " | " | " | - | - | - | 2-Propanol,30 | - | - | 1,9 |
| 92,9 | " | " | " | " | - | - | - | Ethanol,20 | - | - | 2,8 |
| 91,0 | " | " | " | " | EtOH,15 | Toluen ,1.5 | - | - | - | - | 4,6 |
| 90,5 | " | " | " | " | MeOH,20 | - | - | - | - | - | 3,0 |
| 91,3 | " | " | " | " | EtOH,20 | Toluen ,815 mg | - | - | - | - | 3,7 |
| 92,0 | " | " | " | " | EtOH,15 | Phenol,2 g | - | MeOH,15 | - | 15 | 2,6 |
| 93,5 | " | " | " | " | " | Pyridin ,2 g | - | " | - | " | 3,9 |
| 94,5 | " | " | " | " | " | Nitrobenzen ,2 g | - | " | - | " | 3,0 |
| 93,4 | " | " | o-Xylen 5 | " | EtOH,20 (efterfulgt af behandling med | m-Xylen ,4 kogende | 0.9 | EtOH,10 decalin) | - | - | 1,5 |

(fortsætter)



DK 169385 B1

Tabel I (forsat)

| Podophyllotoxin renhed i % | Første krystallisation: Podophyllin g | Første krystallisation: Opløsningsmiddel ml | Første krystallisation: Kompleksdannende middel ml | Første krystallisation: Vand ml | Anden krystallisation: Opløsningsmiddel ml | Anden krystallisation: Kompleksdannende middel ml | Anden krystallisation: Vand ml | Tredie krystallisation: Opløsningsmiddel ml | Tredie krystallisation: Kompleksdannende middel ml | Tredie krystallisation: Vand ml | Udbytte g |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 93,0 | 10 | EtOH,30 | Toluen ,10 | 2 | EtOH,20 | Benzylalkohol | 1,0 | EtOH,10 | - | 10 | 3,7 |
| 91,8 | " | " | " | " | EtOAc,20 | Toluen ,2 | - | - | - | - | 2,9 |
| 92,8 | " | " | " | " | MeOH,20 | " | 1,0 | - | - | - | 3,8 |
| n.d. | " | MeOH,30 | " | " | MeOH,30 | Toluen ,10 | 2,0 | - | - | - | 3,8 |
| n.d. | " | EtOH,30 | Nitrobenzen ,12 | 11 | EtOH,15 | Pyridin ,5 | 6,0 | - | - | - | 4,0 |
| 91,3 | " | " | Toluen ,10 | 2 | " | Anilin ,5 | 4,0 | - | - | - | 3,2 |
| n.d. | " | " | Benzen ,10 | " | EtOH,15 | Benzen ,5 | 1,0 | - | - | - | 3,9 |
| n.d. | " | 1-Butanol,30 | Toluen ,10 | " | Butanol,15 | Toluen ,5 | " | - | - | - | 4,6 |
| n.d. | " | EtOAc,30 | " | " | EtOAc,30 | " | " | - | - | - | 3,4 |
| n.d. | " | EtOH,30 | Isoquinolin ,10 | 15 | EtOH,8 | Toluen , 2,5 | 0,5 | - | - | - | 2,4 |
| n.d. | " | Dioxan ,30 | Toluen ,10 | 2 | Dioxan ,9 | Toluen , 3 | 0,6 | - | - | - | 2,2 |
| n.d. | " | Aceton ,30 | " | 2 | Aceton ,9 | " | " | - | - | - | 2,3 |
| n.d. | " | Acetonitril ,30 | " | " | Acetonitril ,11 | Toluen , 3,5 | 0,7 | - | - | - | 2,5 |
| n.d. | " | Chloroform, 30 | " | " | Chloroform, 14 | Toluen , 4,8 | 1,0 | - | - | - | 3,5 |
| n.d. | " | $ClCH_2CH_2Cl$, 30 | " | " | $ClCH_2CH_2Cl$, 11 | Toluen , 3,8 | 0,8 | - | - | - | 1,3 |
| n.d. | " | Toluen ,30 | - | " | Toluen ,9 | - | 0,6 | - | - | - | 1,2 |



DK 169385 B1

# PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af renset podophyllotoxin over en 2-trins krystallisation af komplekser af podophyllotoxin og spaltning af komplekserne til renset podophyllotoxin, kendetegnet ved, at

(1) en opløsning af urent podophyllotoxin i en lavere alkohol, lavere alkylacetat eller acetone og eventuelt vand i tilstrækkelig mængde til kompleksdannelsen med podophyllotoxinet som kompleksdanner tilsættes toluen, o-, m-, eller p-xylen, anisol, chlorbenzen, anilin, pyridin, phenol, nitrobenzen eller benzylalkohol, hvorved der dannes et kompleks med kompleksdanneren og eventuelt vand og som fraskilles ved krystallisation,

(2) det fraskilte kompleks opløses i den samme eller en anden opløsningsmiddel-komponent end den, som blev anvendt i det foregående trin, hvorefter opløsningen tilsættes den samme eller en anden kompleksdanner end den, som er angivet i (1) og eventuelt vand i tilstrækkelig mængde til kompleksdannelsen, hvorefter det dannede kompleks fraskilles ved krystallisation, og

(3) komplekserne fra det foregående trin renses ved vaskning og/eller omkrystallisation på i og for sig kendt måde under samtidig omdannelse af komplekserne til et renset podophyllotoxinprodukt, eventuelt efterfulgt af en yderligere rensningsbehandling enten ved ekstraktion af en opløsning af det rensede produkt med en NaOH-opløsning eller i kombination med behandling med vandigt NaOH og/eller saltsyre og/eller vand og/eller vandigt natriumchlorid, og isolering af det yderligere rensede podophyllotoxinprodukt.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegnet ved, at der anvendes forskellige organiske komplekserings-komponenter i de to trin.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n - d e t e g n e t ved, at rensningen i det yderligere rensningstrin sker ved, at en opløsning af komplekset fra det andet komplekseringstrin i et med vand ikke-blandbart opløsningsmiddel behandles med natriumhydroxid, og at renset podophyllotoxin isoleres fra opløsningen.