

(19) DANMARK



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **146765 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(21) Patentansøgning nr.: 2391/78

(51) Int.Cl.³: **C 07 D 519/04**

(22) Indleveringsdag: 30 maj 1978

C 07 D 471/12

(41) Alm. tilgængelig: 01 dec 1978

(44) Fremlagt: 27 dec 1983

(86) International ansøgning nr.: —

(30) Prioritet: 31 maj 1977 HU RI 638

(71) Ansøger: *RICHTER GEDEON VEGYESZETI GYAR RT.; Budapest X, HU.

(72) Opfinder: Karola *Jovanovics; HU, Gyoergy *Fekete; HU, Eszter *Dezseri; HU, Lajos *Dancsi; HU, Csaba

*Lorincz; HU, Bela *Szarvady; HU, Gyoergy *Dobo; HU, Csaba *Szentay; HU, Lajos *Szabo; HU.

(74) Fuldmægtig: Kontor for Industriel Eneret

(54) **Fremgangsmåde til isolering af vindolin, catharantin, 3',4'-anhydrovinblastin, vincristin, vinblastin, leurosin, desacetylvinblastin og 4-desacetoxyvinblastin samt N-desmetylvinblastin i til vincristin omdannet form fra tørrede dele af planten Vinca rosea L**

DK 146765 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde af den i patentkravets indledning angivne art til isolering af naturligt vindolin, catharantin, 3',4'-anhydrovinblastin, vincristin, vinblastin, leurosin, desacetylvinblastin og 4-desacetoxyvinblastin samt N-desmetylvinblastin i til vincristin omdannet form fra tørrede dele af planten *Vinca rosea* L.

Til isolering af de to monoindolalkaloider vindolin og catharantin fra den tørrede plante *Vinca rosea* L. udarbejdede Svoboda (J. Am. Pharm. Assoc. 48 (11), 659 (1959)) en metode som kun kan gennemføres med meget beskedent udbytte. Fra 1 kg af den tørrede plante vandtes der, idet man underkastede hele planten en passende behandling, ca. 0,6 g vindolin og 0,05 g catharantin.

3',4'-Anhydrovinblastin er indtil nu hverken blevet isoleret fra planten *Vinca rosea* L. eller identificeret i den.

Til fremstilling af diindolalkaloidkomponenterne ud fra bladene af *Vinca rosea* L. kendes der flere forskellige fremgangsmåder, se fx US-PS 3.097.137, 3.205.220 og 3.225.030, ungarske patentskrifter nr. 153.200, 154.715, 160.967 og 164.958 samt østrigsk patentskrift nr. 313.435 og schweizisk patentskrift nr. 542.488 svarende til de foregående to patentskrifter. Ifølge disse kendte fremgangsmåder kan der fra 1 kg tørrede blade af *Vinca rosea* L. vindes omkring 0,1 til 0,2 g leurosin, og tillige isoleres samtidig vinblastin, vincristin og eventuelt de tilsvarende N-desmetyl-, desacetyl- og desacetoxyderivater.

Det er endvidere velkendt at syntetisk catharantin og vindolin kan kobles ved Polonovszky reaktion til dannelse af 3',4'-anhydrovinblastin, der derefter kan epoxyderes til leurosin (Potier et al., Tetrahedron Letters 3945 (1976); DT-OS 25 58,124; Helv. Chim. Acta 59, 2858 (1976); Heterocycles 4, 998 (1976); BE-PS 842.200). Leurosin selv udviser værdifuld inhiberende virkning over for tumurvækst, og N-desmetyl-N-formylderivatet deraf er det mest lovende stof mod leukæmi (ungarsk patentskrift 165.986 og østrigsk patentskrift 332.566.)

Det er den foreliggende opfindelses formål at tilvejebringe en hensigtsmæssig fremgangsmåde af den i kravindledningen angivne art til isolering i industriel målestok af alkaloidderivater fra planten *Vinca rosea* L., så de kan bruges som naturligt udgangsmateriale til syntese af N-desmetyl-N-formylleurosin

og således at også de andre dimere alkaloider kan isoleres i uændret kvantitet og kvalitet.

Det har nu vist sig at ved ekstraktion af de tørrede plantedele, specielt blade af *Vinca rosea* L. med en ternær blanding bestående af en alkanol med 1-5 kulstofatomer, en tynd vandig syreopløsning og toluen samt påfølgende rensning af den vundne ekstrakt, som indeholder blandingen af alkaloider, ved bl.a. kromatografering opnås en hidtil ukendt effektivitet ved isolationen af de nævnte alkaloider.

I overensstemmelse hermed er fremgangsmåden ifølge opfindelsen ejendommelig ved det i patentkravets kendetegnende del angivne.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen ekstraheres altså de tørrede blade med en ternær blanding bestående af en alkanol med 1-5 kulstofatomer, fortrinsvis metanol, en fortyndet vandig syreopløsning, fortrinsvis en 2-3% vandig opløsning af svovlsyre eller vinsyre, og toluen. Derpå renses ekstrakten ved faseudskiftning og den vundne organiske fase inddampes. Inddampningsresten behandles på i og for sig kendt måde med svovlsyre i ætanol, og herefter fraskilles hovedmængden af diindolalkaloiderne, altså leurosin, vinblastin og vincristin, samt af 4-desacetoxyvinblastin, desacetylvinblastin og N-desmetylvinblastin i form af svovlsyreadditionssalte.

Efter isolering af saltblandingen regulerer man pH-værdien af den vundne moderlud til 5,5-10, ekstraherer opløsningen med et vandublandbart organisk opløsningsmiddel og skiller vindolinet, catharantinet, 3',4'-anhydrovinblastinet og leurosinet fra ekstrakten ved kromatografering, eller også ekstraherer man vindolin i pH-området 2,3-3,5 og ekstraherer catharantinet, 3',4'-anhydrovinblastin og leurosin i pH-området 5-6 med benzen eller en benzenhomolog. Fra sidstnævnte ekstrakt fremstiller man derpå enten en blanding af 3',4'-anhydrovinblastin og leurosin ved krystallisation og epoxyderer blandingen på i og for sig kendt måde eller man adskiller blandingen i komponenterne deraf ved kromatografering, epoxyderer 3',4'-anhydrovinblastin og til slut isolerer catharantin fra den moderlud der vindes ved adskillelse af krystalblandingen; eller også adskiller man den ekstrakt, der indeholder 3',4'-anhydrovinblastin, catharantin og leurosin, i dens komponenter ved kromatografering.

Fra den vundne blanding af svovlsyreadditionssalte kan de enkelte diindolalkaloider adskilles på i og for sig kendt måde. Vincristin og vinblastin kan fx adskilles på den måde der er beskrevet i ungarsk patentskrift nr 160.967.

Ved en anden fremgangsmåde opløses blandingen af svovlsyreadditionssalte af diindolalkaloider i et organisk opløsningsmiddel, hensigtsmæssigt i acetone eller i en alifatisk alkohol med 1-5 kulstofatomer, fortrinsvis metanol, ved 0-50°C, fortrinsvis stuetemperatur.

Diindolalkaloidbaserne frigøres på kendt måde fra opløsningen ved hjælp af en base såsom monoætylamin, diætylamin eller pyridin. Leurosinbasen udfældes fra opløsningen ved 0-25°C.

Den moderlud der vindes ved fraskillelse af leurosin inddampes under nedsat tryk. Inddampningsremanensen opløses i et organisk opløsningsmiddel, fortrinsvis i benzen eller en benzenhomolog såsom toluen eller xylen, fortrinsvis benzen. Samtidig med opløsning af remanensen udfældes sulfatet af den organiske base der anvendes til frigørelse af diindolalkaloiderne (mono-metylamin, diætylamin, pyridin) fra opløsningen og kan frafiltres. Filtratet ekstraheres derefter med en fosfatpuffer med en pH-værdi på 3,7-4,3, fortrinsvis $4 \pm 0,1$. De sure vandige ekstrakter forenes og deres pH-værdi reguleres til 3,5-4,1, fortrinsvis $4,0 \pm 0,1$, ved hjælp af en syre fortrinsvis fosforsyre. Den vundne sure vandige opløsning ekstraheres med en kloreret kulbrinte, fortrinsvis metylenklorid, og vinblastin fraskilles ved inddampning af metylenkloridekstrakten.

Den vandige fases pH reguleres til 7,5-10, fortrinsvis 8,5-9, og vincristin, N-desmetylvinblastin, desacetylvinblastin og 4-desacetoxyvinblastin ekstraheres med et vandublandbart organisk opløsningsmiddel, fortrinsvis en kloreret kulbrinte. Ved formylering af alkaloidblandingen omdannes på kendt måde N-desmetylvinblastin til vincristin. pH-værdien af alkaloidblandingen, der nu består af tre komponenter, reguleres igen til 7,5-10 og alkaloiderne ekstraheres med et organisk opløsningsmiddel eller opløsningsmiddelblanding, fortrinsvis med en blanding af benzenhomologer - incl. benzen - og en kloreret kulbrinte, fortrinsvis i en blanding af benzen og kloroform, og den vundne opløsning underkastes søjle-kromatografering. Som adsorbent bruges aluminiumoxyd, fortrinsvis deaktiveret aluminiumoxyd, og elueringen udføres hensigtsmæssigt med en organisk opløsningsmiddelblanding, fortrinsvis med forskel-

lige blandinger af benzen og kloroform. De alkaloider der findes i de fraktioner der vindes efter søjlekromatograferingen, identificeres fortrinsvis ved tyndtlagskromatografi. De eluater der indeholder samme alkaloidkomponent forenes. De fraktioner hvori vincristin og vinblastin er til stede underkastes derefter i og for sig kendt behandling til adskillelse af disse alkaloider, mens de fraktioner hvori 4-desacetoxyvinblastin opdages forenes og derefter inddampes i vakuum. Eventuelt kan det rå 4-desacetoxyvinblastin renses ved krystallisation.

Fra den moderlud der vindes når diindolalkaloiderne frafiltreres, kan der vindes en yderligere betydelig mængde leurosine, catharantin og vindolin såvel som 3',4'-anhydrovinblastin ved at man følger en reaktionsvariant a) eller reaktionsvariant b) ifølge opfindelsen.

Ifølge procesvarianten a) reguleres moderludens pH-værdi til 5,5-10 og de ovenfor anførte fire alkaloider ekstraheres med et vandublandbart organisk opløsningsmiddel, hensigtsmæssigt med benzen eller en homolog dertil eller en kloreret kulbrinte eller alifatisk æter, og den vundne alkaloidblanding adskilles i komponenter ved søjlekromatografering, fortrinsvis udført på en delvis deaktiveret aluminiumoxydkolonne. Elueringen udføres med benzen og derefter med en blanding af benzen og en kloreret kulbrinte.

Når man følger procesvariant b) ifølge opfindelsen, syrenes moderluden først til en pH-værdi på 2,5-3,5, og vindolinet ekstraheres fra den vundne sure blanding, fortrinsvis ved hjælp af benzen eller en homolog dertil. Den organiske ekstrakt fra-skilles derefter, inddampes og renses eventuelt fx ved affarvning og/eller omkrystallisation til at give vindolin. Den sure vandige fase pH reguleres derefter til 5-6 og de tre alkaloider der findes deri, nemlig catharantin, 3',4'-anhydrovinblastin og leurosine, ekstraheres med benzen eller homologer dertil. Ekstrakten underkastes enten kromatografi (procesvariant b₂)) på en kolonne fremstillet af delvis deaktiveret aluminiumoxyd til eluering ved hjælp af benzen eller homologer dertil, og derefter en blanding af benzen og en kloreret kulbrinte, eller ekstrakten behandles i overensstemmelse med procesvariant b₁).

Når man går frem efter procesvarianten b₁), inddampes den ekstrakt som indeholder de tre alkaloidkomponenter. Inddamp-

ningsremanensen krystalliseres fra et organisk opløsningsmiddel, fortrinsvis en alkohol med 1-5 kulstofatomer. Der vindes en krystalblanding af leurosin og 3',4'-anhydrovinblastin, og catharan-tinet forbliver opløst i moderluden.

Den vundne krystalblanding epoxyderes fortrinsvis in situ uden forudgående fraskillelse af leurosinet. Ved epoxydering omdannes 3',4'-anhydrovinblastin til leurosin, dvs. at hele alkaloidindholdet i krystalblandingen vil være til stede i form af leurosin. Epoxyderingen udføres fortrinsvis med organiske hydroperoxyder, fx med coumylhydroperoxyd eller p-butylhydroperoxyd, eller med alkalimetahypohalogeniter eller oxygen, hensigtsmæssigt stammende fra luften. Når epoxyderingen udføres med oxygen forløber reaktionen selektivt praktisk talt i et hvilket som helst organisk opløsningsmiddel. Eksempler på egnede organiske opløsningsmidler er tetrahydrofuran og organiske aminosforbindelser, fortrinsvis dimetylformamid. Når der bruges organiske peroxyder til epoxyderingen udføres reaktionen fortrinsvis i et opløsningsmiddel af nitriltypen. Eventuelt kan promotorer såsom metalkomplekser, metal- eller metaloxydkatalysatorer eller radikal-igangsættere indeholdende en nitril- og/eller azogruppe også være til stede i reaktionsblandingen.

Krystalblandingen kan også adskilles i sine komponenter ved kromatografering, og når leurosin er isoleret epoxyderes 3',4'-anhydrovinblastin til leurosin som beskrevet ovenfor.

Når komponenterne er blevet adskilt fra hinanden ved hjælp af søjlekromatografering, analyseres de vundne eluatfraktioner ved tyndtlagskromatografi med silikagel som adsorbent og 5:0,5 blanding af metylenklorid og metanol som opløsningsmiddelblanding. Tyndtlagskromatografi kan også udføres som beskrevet i USA-farmakopien side XVIII.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen skal i det følgende belyses mere udførligt ved nogle eksempler.

Eksempel 1

A) 1 kg malede tørrede blade af *Vinca rosea* L befugtes med en blanding af 1 liter metanol og 0,25 liter af en 2% vandig svovlsyreopløsning. Der tilsættes 5 liter toluen og blandingen omrøres i 1,5 timer. Toluenekstraktionen gentages yderligere 3

gange med samme mængde toluen. Toluenfaserne fraskilles derefter, forenes og ekstraheres med 3 x 5 liter 2% vandig svovlsyreopløsning indtil der ikke kan konstateres spor af alkaloid. De sure vandige opløsninger forenes og klorofyl og andre farvestoffer ekstraheres med 2 x 1 liter benzen. Den vandige fase fraskilles og dens pH-værdi reguleres til 8,5-9 med en vandig opløsning af ammoniumhydroxyd. Den alkaliske opløsning ekstraheres derefter med 4 x 1 liter benzen og benzenekstrakterne forenes, tørres med natriumsulfat og filtreres og filtratet inddampes til tørhed. Der vindes en alkaloidbaseblanding som vejer ca. 10 g, og den behandles derefter med svovlsyre i ætanol på i og for sig kendt måde for at give en blanding af sulfaterne af diindolalkaloiderne (vinkristin, leurosin, vinblastin, desacetoxyvinblastin, N-des-metylvinblastin og desacetylvinblastin). Vægten af sulfatsaltblandingen andrager 0,73 g hvorfra der vindes 0,18 g leurosin med smp. 202-204°C, $[\alpha]_D^{20} = +79,4^\circ$ (c = 1 i kloroform); samt en sædvanlig mængde af de ovennævnte diindolalkaloider på konventionel måde.

B) Den moderlud I som vindes ved filtrering af den ovennævnte saltblanding (ca. 100 ml) fortyndes med 1,5 liter vand og reguleres derefter til pH 2,7-3,0. Den sure opløsning ekstraheres med 5 x 1 liter benzen og faserne får lov til at skille sig ad. De sure faser forenes og sættes til side (moderlud II). Benzenekstrakterne forenes, tørres med natriumsulfat og filtreres og filtratet inddampes til tørhed. Inddampningsremanensen opløses i 12 ml benzen, rystes med 0,5 g aktive kul og føres gennem et lag af aluminiumoxyd (aktivitetsgrad III). Laget vaskes derefter vindolfrit med 150-200 ml benzen. Benzenfiltratet inddampes, indampningsremanensen opløses i 5 ml æter og de udfældede krystaller filtreres, vaskes med 2 x 1 ml æter og tørres til slut. Udbytte 0,8 g vindolin med smp. 167-168°C, $[\alpha]_D^{20} = -28,5^\circ$ (c = 1 i kloroform).

C) pH-værdien af moderluden II reguleres til 5,5 med en tynd vandig ammoniumhydroxydopløsning og opløsningen ekstraheres med 3-5 portioner ^{1 liter} benzen. Ekstraktionens fremadskriden overvåges ved tyndtlagskromatografi og den til ekstraktion værende opløsning reguleres til pH 5,5 før tilsætning af hver portion benzen. Benzenekstrakterne forenes og inddampes og indampningsremanensen krystalliseres fra metanol. Krystallerne frafiltreres og den metano-

liske moderlud sættes til side til yderligere behandling. Udbytte 0,35 g af en 1:1 blanding af leurosin og 3',4'-anhydrovinblastin.

D) Den produktblanding der vandtes i eksempel 1 C) epoxyderes med oxygen fra luften i et medium af dimetylformamid og på i og for sig kendt måde, og det vundne leurosin fraskilles fra reaktionsblandingen.

Udbytte 0,25 g leurosin med samme kvalitet som de 0,18 g leurosin der vandtes i eksempel 1 A).

E) Den metanoliske moderlud som vandtes ved krystallisation af leurosin og anhydrovinblastin (eksempel 1 C)) inddampes. Inddampningsremanensen opløses i 12 ml benzen og benzenopløsningen kromatograferes på en kolonne fremstillet ud fra 100 g aluminiumoxyd med aktivitetsgrad III og behandlet med benzen. Catharantin elueres med benzen idet der opsamles fraktioner på 50 ml af eluatet. Elueringens fremadskriden overvåges ved tyndtlagskromatografi. Catharantin indeholdes hovedsagelig i 4. fraktion.

Fraktioner indeholdende catharantin forenes og inddampes derefter til tørhed. Remanensen opløses i en 1,25% opløsning af svovlsyre i ætanol (pH 4,5-5,0) og henstår til krystallisation natten over. Krystallerne frafiltreres, vaskes med 1-2 ml ætanol og tørres.

Udbytte 0,41 g catharantinsulfat, $[\alpha]_D^{20} = +58^\circ$ (c = 1,96% i ætanol).

Eksempel 2

Moderlud I, vundet ved filtrering af den dimere alkaloid sulfatsaltblanding fremstillet ud fra 1 kg tørrede blade ifølge eksempel 1 A) (ca. 100 ml). fortyndes med 1,5 liter vand og pH-værdien reguleres til 8,5-9 med en koncentreret vandig opløsning af ammoniumhydroxyd. Den vundne alkaliske opløsning ekstraheres med 4 x 1 liter benzen og de forenede benzenekstrakter tørres med natriumsulfat og filtreres og filtratet inddampes. Inddampningsremanensen opløses i 55 ml benzen og opløsningen kromatograferes på en kolonne fremstillet ud fra 450 g aluminiumoxyd med aktivitetsgrad III med benzen. Til eluering bruges der 2 liter benzen og derefter 4,5 liter af en 3:2 blanding af benzen og kloroform. Der opsamles fraktioner på 200 ml og de afprøves for alkaloidindhold ved tyndtlagskromatografi. De første fire fraktioner er fri for

alkaloid. Fraktionerne nr. 5-9 indeholder catharantin, fraktionerne nr. 21-26 vindolin og fraktionerne nr. 27 og 28 en blanding af vindolin og 3',4'-anhydrovinblastin. I fraktionerne nr. 29-34 konstateres der leurosin. De eluatfraktioner som indeholder samme alkaloid forenes og inddampes til tørhed.

Udbytte 0,57 g catharantin hvorfra 0,52 g af det tilsvarende sulfat kan fremstilles (fraktionerne nr. 5-9).

0,145 g 3',4'-anhydrovinblastin (fra fraktionerne nr. 27-28, krystalliseret fra metanol), smp. 212-214°C, $[\alpha]_D^{20} = +64,2^\circ$ (c = 0,5 i kloroform).

0,125 g leurosin (fra fraktionerne nr. 29-34, krystalliseret fra metanol).

0,78 g vindolin (inddampning af den metanoliske moderlud fra 3',4'-anhydrovinblastin og fraktionerne nr. 21-26 samt krystallisation af det vundne produkt fra æter).

0,145 g 3',4'-anhydrovinblastin, vundet som beskrevet ovenfor, opløses i 20 ml dimetylformamid. Der bobles en langsom oxygenstrøm gennem opløsningen i 10 minutter og blandingen henstår ved stuetemperatur i 16-20 timer. Derefter sættes der en koncentreret opløsning af ammoniumhydroxyd til reaktionsblandingen for at regulere pH til 8,5, og den alkaliske blanding ekstraheres med 3 x 25 ml benzen. De forenede benzenekstrakter tørres med natriumsulfat og filtreres og filtraterne inddampes. Inddampningsremanensen krystalliseres fra 1 ml metanol.

Udbytte 0,11 g (75%) leurosin.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåde til isolering af naturligt vindolin, catharantin, 3',4'-anhydrovinblastin, vincristin, vinblastin, leurosin, desacetylvinblastin og 4-desacetoxyvinblastin samt N-desmetylvinblastin i til vincristin omdannet form fra tørrede dele af planten Vinca rosea L. ved ekstraktion af de tørrede plantedele, rensning af den derved vundne alkaloidextrakt ved faseudskiftningsmetoden, inddampning af den organiske fase, behandling af inddampningsresten med svovlsyre i ætanol til fraskillelse af hovedmængden af leurosin, vinblastin og vincristin samt af 4-desacetoxyvinblastin, desacetylvinblastin og N-desmetylvinblastin i form af svovlsyreadditionssalte fra en moderlud og oparbejdning af saltblandingen, hvorved om ønsket vinblastin, leurosin, vincristin, det ved formylering til vincristin omdannede N-desmetylvinblastin samt desacetylvinblastin og desacetoxyvinblastin fraskilles, k e n d e t e g n e t ved at man til ekstraktion af de tørrede plantedele af Vinca rosea L. anvender en ternær blanding bestående af en alkanol med 1-5 kulstofatomer, en fortyndet vandig syreopløsning og toluen, og

- a) regulerer pH-værdien af den moderlud der vindes ved isolering af saltblandingen til 5,5-10, ekstraherer opløsningen med et vandublandbart organisk opløsningsmiddel og fraskiller vindolin, catharantin, 3',4'-anhydrovinblastin og leurosin fra ekstrakten ved kromatografering, eller
- b) ekstraherer vindolin i pH-området 2,5-3,5 og catharantin, 3',4'-anhydrovinblastin og leurosin i pH-området 5-6 med benzen eller en benzenhomolog fra den moderlud der vindes ved isolering af saltblandingen og
- b₁) fraskiller en blanding af leurosin og 3',4'-anhydrovinblastin ved krystallisation, epoxyderer denne blanding på i og før sig kendt måde eller først adskiller blandingen i dens komponenter ved kromatografering og derefter epoxyderer 3',4'-anhydrovinblastin-komponenten, og isolerer catharantin fra den moderlud der vindes ved adskillelse af den krystallinske blanding, eller
- b₂) adskiller den ekstrakt som indeholder catharantin, 3',4'-anhydrovinblastin og leurosin i sine komponenter ved kromatografering.

Fremdragne publikationer:

DE offentliggørelsesskrift nr. 2519533
DE fremlægelsesskrift nr. 2124023
US patenter nr. 3097137, 3205220.