

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 166364 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 5841/85

(51) Int.Cl.5

C 07 F 9/10

(22) Indleveringsdag: 16 dec 1985

(41) Alm. tilgængelig: 18 jun 1986

(44) Fremlagt: 13 apr 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 17 dec 1984 DE 3445949

(71) Ansøger: *A. Nattermann & Cie GmbH; Nattermannallee 1; D-W-5000 Koeln 30, DE

(72) Opfinder: Bernd-Rainer *Guenther; DE, Rainer *Losch; DE

(74) Fuldmægtig: Th. Ostefeld Patentbureau A/S

(54) Fremgangsmåde til isolering af ledsagephospholipidfrit phosphatidylcholin fra en vegetabilsk lipidblanding

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

5841-85

Fremgangsmåde til isolering af phosphatidylcholin fra vegetabiliske lipidblandinger ved hvilken man opløser lipidblandingen med en opløsningsmiddelblanding af en laverekogende petroleumsetherfraktion (40-80°C), en C₁-C₄ lavere alkanol og vand, kommer opløsningen på en med silicagel fyldt søjle ved en temperatur i området fra 20-50°C, ved denne temperatur eluerer med samme opløsningsmiddelblanding, og derved opnår et ledsagephospholipidfrit phosphatidylcholin i hovedløbet.

DK 166364 B

Den foreliggende opfindelse angår en særlig fremgangsmåde til isolering af højrent 1,2-diacyl-glycero-3-phosphocholin (phosphatidylcholin), som er frit for ledsagephospholipider, ved chromatografi af en lipidopløsning på silicagel.

- 5 Inden for farmacien anvendes vegetabilsk phosphatidylcholin som aktivt stof og som hjælpestof.

Til anvendelsen som aktivt stof kræves phospholipider med højt phosphatidylcholinindhold (oral applikation) eller næsten lysophosphatidylcholinfrit phosphatidylcholin med høj renhed (intravenøs applika-
10 tion).

Til anvendelsen som hjælpestof, for eksempel som emulgator ved fremstilling af fedtemulsioner til parenteral applikation eller ved dannelsen af liposomer eller blandingsmiceller, må phosphatidylcholinet være frit for hæmolytisk virkende lysophosphatidylcholin.

- 15 Som udgangsmateriale for udvindingen af vegetabilsk phosphatidylcholin anvendes det ved sojaolie- eller spiseoliefremstillingen opståede såkaldte råphosphatid, der også betegnes rålecithin, handelssojalecithin eller handelslecithin.

(Kirk-Othmer, Encycl. Chem. Technol. Vol. 14, side 250-269/P.H. List, Pharm. Verfahrenstechn. heute 1 (7) 1-8 (1980)).
20

Sojalecithin (sojaråphosphatid) indeholder:

- 60 - 70 % polære lipider (phospholipider/glykolipider)
27 - 37 % sojaolie
25 1,5 - 2 % vand
0,5 - 2 % forskellige ledsagestoffer.

De polære lipider, der også betegnes som renlecithin, og som opnås ved fjernelse af olie fra rålecithinet eller sojalecithinet, har følgen-
30 de sammensætning (cirkaværdier):

	30 %	phosphatidylcholin	(PC)
	2 %	lysophosphatidylcholin	(LPC)
	22 %	phosphatidylethanolamin	(PE)
	2 %	lysophosphatidylethanolamin	(LPE)
5	3 %	phosphatidylserin	(PS)
	15 %	phosphatidylinosit	(PI)
	1 %	lysophosphatidylinosid	(LPI)
	13 %	phytoglykolipider	(PGL)
	8 %	phosphatidsyre	(PA)
10	4 %	ledsagelipider	

Et sojalecithin (sojaråphosphatid) af dårlig kvalitet kan indeholde indtil 5% lysophosphatidylcholin.

Der kendes en række fremgangsmåder til fremstilling af berigede
 15 phosphatidylcholinfraktioner. Således opnås ved fjernelse af olie fra sojaråphosphatid med acetone (US patentskrift nr. 3.268.335) en blanding af polære lipider (renlecithin). Ved alkoholisk ekstraktion af sojaråphosphatid (DE patentskrift nr. 1.492.952) opnås en olieholdig blanding af phosphatidylcholinberigede polære lipider.

20 I den seneste tid er der beskrevet nye teknologier til udvinding af polære lipider for eksempel i DE offentliggørelsesskrift nr. 3.011.185, hvor olie fjernes fra sojaråphosphatid ved ekstraktion med overkritisk CO₂, eller i europapatentansøgning nr. 0049914, hvor der ved hjælp af ultrafiltrering opnås phosphatidylcholinberigede fraktioner fra opløs-
 25 ninger af phospholipider i hexan/2-propanol (75/25). Hvis der ved denne fremgangsmåde anvendes olieholdige phospholipidblandinger såsom sojaråphosphatid, er hverken oliefjernelse med acetone eller anvendelse af en opløsningsmiddelgradient nødvendig.

Udvindingen af et ledsagephospholipidfrit phosphatidylcholin forud-
 30 sætter en chromatografisk adskillelse af phospholipiderne. Derved får kombinationen af adsorptionsmidlet og elueringsmidlet og elueringstemperaturen en udslagsgivende betydning.

Således opnår man, ved at gå ud fra sojaråphosphatid, ved en flertrinsproces et 3 - 4% lysophosphatidylcholinholdigt rent phosphatidyl-
 35 cholin ved chromatografi på aluminiumoxid med ethanol som elueringsmiddel (US patentskrift nr. 3.031.478). Aluminiumoxidet opfyldes med phospholipider såsom phosphatidylethanolamin, phosphatidylinosit, phosphatidsyre og glykolipider. Da det ikke kan regenereres, må det kasseres.

Silicagel anvendes hyppigt som adsorptionsmiddel til adskillelse af phospholipider. DE offentliggørelsesskrift nr. 2.915.614 beskriver en fremgangsmåde til adskillelse af olie og steroler fra sojaråphosphatider med det formål, at udvinde renlecithin ved chromatografi af en petroleumsetheropløsning på silicagel. Herved bliver olie og steroler på silicagelen, og de må elueres med polære opløsningsmidler i en anden høst. Ud fra alkoholiske opløsninger tilbageholdes phospholipider af silicagel ved stuetemperatur (H. Richter et al. Pharmazie 1977, 32, 164). Adskillelsen eller den selektive desorption af phosphatiderne sker enten med alkohol/ammoniak (Japan Kokai 49093400) eller med blandinger af chloroform/methanol eller chloroform/methanol/vand (DDR patentskrift nr. 79 916). Principielt er det muligt at udvinde et lysophosphatidylcholin frit phosphatidylcholin ved chromatografi på silicagel under anvendelse af en elueringsmiddelgradient af chloroform/methanol eller chloroform/methanol/vand. Genvindingen og fjernelsen af sådanne opløsningsmiddelblandinger fra slutproduktet er meget bekostelig, specielt når der er tale om en gradienteluering (til dels azeotrope blandinger).

Den i DE offentliggørelsesskrift nr. 3.047.048 beskrevne fremgangsmåde til isolering af phosphatidylcholin fra alkoholiske phospholipidopløsninger ved hjælp af silicagelsøjlechromatografi ved forhøjet temperatur består af to trin:

1. ekstraktion fra sojaråphosphatid
phosphatidylcholinudbytte: ca. 60%
2. søjlechromatografisk rensning
phosphatidylcholinudbytte: ca. 73%

Over begge trin foreligger et phosphatidylcholinudbytte på ca. 44% af det teoretiske beregnet ud fra sojaråphosphatid. Denne virkningsgrad er utilfredsstillende. Phosphatidylcholinet indeholder desuden spor af phosphatidylethanolamin og lysophosphatidylcholin. Da lysophosphatidylcholinet på grund af fremgangsmåden ikke kan fraskilles, er kun et sojaråphosphatid af bedste kvalitet med et lysophosphatidylcholinindhold på 0,5% egnet som udgangsmateriale.

Alle hidtil beskrevne fremgangsmåder til isolering af ledsagephosphatidfrit phosphatidylcholin fra sojaråphosphatid er mere eller mindre behæftet med mangler såsom:

- fremgangsmåder i flere trin
- ringe phosphatidylcholinudbytter
- anvendelse af kun vanskeligt regenererbare
- 5 opløsningsmiddelblandinger til den søjlechromatografiske adskillelse, til dels med elueringsmiddelgradienter
- anvendelse af toksiske opløsningsmidler
- selektivt valg af udgangsmaterialer med hensyn til lysophosphatidylcholin
- 10 - ikke regenererbare adsorptionsmidler
- tilstedeværelse af ledsagephospholipider såsom phosphatidylethanolamin og lysophosphatidylcholin i slutproduktet
- lavere phosphatidylcholinindhold

15 Disse ulemper indvirker nødvendigvis på fremstillingsomkostningerne eller fører ikke til det ønskede ledsagephospholipidfrie phosphatidylcholin.

Den foreliggende opfindelse har som formål at tilvejebringe en simpel fremgangsmåde til isolering af et ledsagephospholipidfrit, navnlig
20 lysophosphatidylcholin frit phosphatidylcholin fra råphosphatider (soja, raps, solsikke).

Det har nu overraskende vist sig, at man ved en et-trins proces opnår et ledsagephospholipidfrit phosphatidylcholin ud fra en råphosphatidopløsning ved hjælp af silicagelsøjlechromatografi.

25 Den foreliggende opfindelse angår i overensstemmelse hermed en særlig fremgangsmåde til isolering af ledsagephospholipidfrit phosphatidylcholin fra en vegetabilsk lipidblanding, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man opløser lipidblandingen med en opløsningsmiddelblanding af en laverekogende petroleumsetherfraktion (40-80°C), en C₁-C₄
30 lavere alkanol og vand, kommer opløsningen på en med silicagel fyldt søjle ved en temperatur i området fra 20-50°C, ved denne temperatur eluerer med samme opløsningsmiddelblanding og derved opnår et ledsagephospholipidfrit phosphatidylcholin i hovedløbet. Der anvendes fortrinsvis en opløsningsmiddelblanding af 1 volumendel letbenzin (65-73°C), 1 volumendel 2-propanol og 0,175 volumendele vand.

I for- og efterløbet fraskilles de i råphosphatidet forekommende lipider. Det har overraskende vist sig, at det ud fra en sådan blanding af mange stoffer er muligt ved en et-trins proces at isolere højrent

phosphatidylcholin (hovedløb), som kun fortsat er forurennet med spor af glykolipider.

Glykolipiderne kan fjernes på kendt måde for eksempel ved ekstraktion af phosphatidylcholin med ethanol (glykolipider er uopløselige i ethanol). Man opnår således et ledsagestof-, navnlig lysophosphatidylcholin frit phosphatidylcholin i høj renhed.

Phosphatidylcholin virkningsgraden udgør for eksempel ved rent sojaphosphatidylcholin 88% af det teoretiske eller ved phosphatidylcholin af høj renhed 86% af det teoretiske beregnet ud fra det anvendte sojaråphosphatid og ligger dermed i en ikke tidligere opnået størrelsesorden.

Ud over den simple fremgangsmåde frembyder den nye fremgangsmåde også den fordel, at også mindreværdige råphosphatider kan anvendes. Dette gælder også for de ud fra mindreværdige råphosphatider ved kendte måder fremstillede phosphatidylcholiner, som er forurennet med lysophosphatidylcholin.

Som silicagel kan anvendes sædvanlige produkter til chromatografi af forskellig kornstørrelse eller presset silicagel, som kan være aktiveret eller desaktiveret. Der anvendes fortrinsvis neutral silicagel.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen udføres ved en temperatur i området fra 20-50°C og kan udføres ved normaltryk eller ved overtryk.

En ganske speciel fordel ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen består i, at man efter udført chromatografi igen kan anvende silicagelen. Samtlige forureninger opfanges i forløbet eller i efterløbet. Der kan desuden ses bort fra efterløbet, da de i søjlen værende forureninger ved fornyet belastning af denne bliver elueret med det næste forløb.

En yderligere fordel ligger i anvendelsen af en let destillerbar opløsningsmiddelblanding.

Sammenligningen med kendte fremgangsmåder viser de omkostningsmæssige fordele ved den nye et-trinsfremgangsmåde. Sojaphosphatidylcholinet udvindes for eksempel fra sojaphosphatid med en virkningsgrad på 88%. Ved en søjlechromatografisk adskillelse adskilles 110 g sojaråphosphatid over 200 g silicagel, hvortil der kun kræves 4,4 l samlet eluat. Fremgangsmåden har snarere karakter af en filtrering end af en søjlechromatografisk rensning i sædvanlig forstand.

Opfindelsen belyses nærmere i de efterfølgende eksempler nr. 1, 2, 4 og 5. Eksempel 3 er et sammenligningseksempel.

Analysemetode

Phospholipiderne analyseredes ved hjælp af tyndtlagschromatografi. Olieindholdet blev sat lig med den dialyserbare del. Vandet bestemtes efter Karl Fischer, og restopløsningsmiddelindholdet bestemtes gaschromatografisk.

Opløsnings- og elueringsmiddelblanding

Der anvendtes en blanding af 1 volumendel letbenzin (65-73°C), 1 volumendel 2-propanol og 0,175 volumendele vand.

Søjlechromatografi

Der anvendtes en dobbeltkappechromatografisøjle (indvendig diameter 4,5 cm, højde 37 cm). En varmeveksler var indskudt før søjlen. Søjlen fyldtes med en opslæmning af 200 g silicagel (Woelm) i den angivne opløsningsmiddelblanding. Efter udført chromatografi kan silicagelen benyttes igen.

Udgangsmateriale

Der anvendtes råphosphatider med følgende sammensætning:

20

		Soja	Raps	Solsikke
	phosphatidylcholin (PC)	16%	18%	22%
	phosphatidylethanolamin (PE)	17%	13%	13%
25	lysophosphatidylcholin (LPC)	2,5%	2,6%	1,0%
	phosphatidylinosit (PI)	9%	12%	13%
	N-acyl-phosphatidyl-ethanolamin (N-acyl-PE)	2%	1%	1%
	phosphatidsyre (PA)	8%	7%	5%
30	olie	35%	36%	30%
	Rest: andre lipider			

Eksempel 1

450 ml af en opløsning af 110 g sojaråphosphatid (med 16% PC og 2,5% LPC) i den angivne opløsningsmiddelblanding sættes til en med silicagel (200 g) fyldt chromatografisøjle og elueres med samme opløsningsmiddelblanding ved stuetemperatur. Det samlede eluat inddeles i tre fraktioner. Fraktionerne indampes, og remanensen analyseres.

1. fraktion 0 - 1,6 l Remanens: 89,5 g
indeholder neutrallipider, glykolipider og
phospholipider såsom PE, N-acyl-PE, PA, PI
5 og spor af PC
2. fraktion 1,8 - 4,4 l Remanens: 18 g (rent phos-
phatidylcholin)
PC-indhold: 86%
10 olieindhold: 0,5%

Tyndtlagschromatografisk undersøgelse viser ud over PC kun glykoli-
pider som forurening. PC-virkningsgrad: 88% af det teoretiske beregnet i
forhold til sojaråphosphatid.

- 15 3. fraktion 4,4 l - 5,0 l Remanens: 2 g
indeholder PC, LPC og spor af glykolipider

En ringe PC-mængde bliver tilbage i silicagelen.
20 18 g af fraktion 2 med 86% phosphatidylcholin røres sammen med 200
ml 95%-ig ethanol ved stuetemperatur i en time. De uopløselige glykoli-
pider frafiltreres over 1 g aluminiumoxid som filterhjælpemiddel. Fil-
tratet indampes og remanensen analyseres.

- 25 Remanens: 15,8 g (phosphatidylcholin med høj renhed)
PC-indhold: 96 %
vand: 1,6 %
olie: 0,5 %
ethanol: 0,8 %
30 PC-virkningsgrad: 86 % af det teoretiske beregnet i forhold
til sojaphosphatid
renhed (TLC): der påvistes ingen yderligere forureninger.

Eksempel 2

- 35 Et forsøg svarende til eksempel 1 gennemførtes med en søjletempera-
tur på 50°C. Der foretoges samme fraktionsopdelinger med uforandret sam-
let eluatvolumen. Den anden fraktion indeholdt 16,5 g faststof med 87%
PC (rent phosphatidylcholin). Renheden ved tyndtlagschromatografi svare-

Eksempel 3

5 nr. 3.047.048)

10	Remanens:	110 g
	PC-indhold:	30%
	PC-virkningsgrad:	60% af det teoretiske beregnet i forhold til sojaphosphatid

20

25

30

35

	Remanens:	22 g
	PC-indhold:	95%
	olieindhold:	$\leq 0,5\%$
	LPC-indhold:	$\leq 0,2\%$ (påvisningsgrænse)
5	PC-virkningsgrad:	80% af det teoretiske beregnet i forhold til det anvendte materiale
	vand:	1,5%

Eksempel 4

10 500 ml af en opløsning af 125 g solsikkeråphosphatid med 22% PC og 1,0% LPC i den angivne opløsningsmiddelblanding sættes til en med silicagel (200 g) fyldt chromatografisøjle og elueres med samme opløsningsmiddelblanding ved stuetemperatur. Det samlede eluat inddeles i to fraktioner. Fraktionerne inddampes, og remanensen analyseres.

15

1. fraktion 0 - 1,0 l Remanens: 97 g
indeholder neutrallipider, glykolipider og phospholipider såsom PE, N-acyl-PE, PA, PI og spor af PC.

20

2. fraktion 1,0 - 4,0 l Remanens: 26 g
PC-indhold: 87 %
olieindhold: 0,7%

25 Undersøgelse ved tyndtlagschromatografi viser, at der ud over PC kun er glykolipider som forurening. PC-virkningsgrad: 83% af det teoretiske beregnet ud fra solsikkeråphosphatid.

Der bliver en lille smule PC tilbage i silicagelen.

26 g af 2. fraktion med 87% phosphatidylcholin røres sammen med 200
30 ml 95%-ig ethanol ved stuetemperatur i en time. De uopløselige glykolipider filtreres over 1 g aluminiumoxid som filterhjælpemiddel. Filtratet inddampes, og remanensen analyseres.

35

	Remanens:	23,2 g (phosphatidylcholin i høj renhed)
	PC-indhold:	97 %
	olieindhold:	0,7 %
	tørstoftab:	1,5 %
5	PC-virkningsgrad:	82 % af det teoretiske beregnet i forhold til solsikkephosphatid
	renhed (TLC):	der påvistes ingen yderligere forureninger

Eksempel 5

- 10 500 ml af en opløsning af 160 g rapsråphosphatid (18% PC, 2,6% LPC)
i den angivne opløsningsmiddelblanding behandledes som i eksempel 4.

	Remanens:	20,7 g (phosphatidylcholin i høj renhed)
	PC-indhold:	96 %
15	olieindhold:	1,3 %
	tørstoftab:	2,0 %
	PC-virkningsgrad:	69 % af det teoretiske beregnet i forhold til solsikkephosphatid
	renhed (TLC):	der påvistes ingen yderligere forureninger

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til isolering af ledsagephospholipidfrit phosphatidylcholin fra en vegetabilsk lipidblanding, KENDETEGNET ved, AT man
5 opløser lipidblandingen med en opløsningsmiddelblanding af en laverekogende petroleumsetherfraktion (40-80°C), en C₁-C₄ lavere alkanol og vand, kommer opløsningen på en med silicagel fyldt søjle ved en temperatur i området fra 20-50°C, ved denne temperatur eluerer med samme opløsningsmiddelblanding og derved opnår et ledsagephospholipidfrit phosphatidyl-
10 cholin i hovedløbet.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, AT man anvender en opløsningsmiddelblanding af 1 volumendel af en petroleumsetherfraktion (65-73°C), 1 volumendel 2-propanol og 0,175 volumendele vand.
15

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, KENDETEGNET ved, AT lipidblandingen kan være sammensat af polære og upolære vegetabiliske lipider, således som de forekommer i råphosphatider (rålecithiner).

20 4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, KENDETEGNET ved, AT lipidblandingen består af phosphatidylcholinholdige phospholipider.

25

30