



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

223986 ✓

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 07 D 311/40

(22) Přihlášeno 07 10 80
(21) (PV 6757-80)

(40) Zveřejněno 25 02 83

(45) Vydáno 15 12 85

(72) Autor vynálezu

MADAUS ROLF dr., KÖLN-BRÜCK, GÖRLER KLAUS dr., BENSBERG-REFRATH,
MOLLS WERNER dr., ODENTHAL-SCHWEISIG (NSR)

(73) Majitel patentu

Dr. MADAUS & Co., KÖLN (NSR)

(54) Způsob získávání silymarinu

1

Vynález se týká způsobu získávání čistého silymarinu extrakcí plodů ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* Gaertn.).

Pod označením silymarin se rozumí podle stávajícího stavu techniky skupina silymarinů, tj. polyhydroxyfenylchromanonů (silymarin I-IV), které už byly z plodů ostropestřce mariánského izolovány v 70 až 80% čistotě, vždy podle drogy (německý vykládací spis č. 1 923 082).

Silymarin I až silymarin III jsou izomery sumárního vzorce $C_{25}H_{22}O_{10}$, v literatuře byly charakterizovány strukturně chemicky jako silybin, silydianin a silichristin (německý vykládací spis č. 1 923 082; A. Pelter, R. Hänsel: Tetrahedron Letters, Londýn 25, 2 911 (1968); H. Wagner, L. Hörhammer, O. Seligmann a N. R. Farnsworth: Tetrahedron Letters 31, 2 675 až 2 678 (1970); H. Wagner, O. Seligmann, L. Hörhammer a M. Seitz: Tetrahedron Letters 22, 1 895 až 1 899 (1971)). Silymarin IV je taxifolin (německý vykládací spis č. 1 923 082).

Silymarin je cenné jaterní terapeutikum a směs silymarinů je v důsledku synergismu účinnější než souhrn účinků jednotlivých izomerů (německý vykládací spis č. 1 923 082).

Z německého vykládacího spisu č. 1 923 082 je známý způsob získávání silymarinu (silymarin I-IV), při němž se sušené plody ostropestřce mariánského Gaertn. mechanicky vylisují, aby se zbavily hlavního množství mastného oleje. Vyčerpávající extrakcí zbytku po vylisování etylacetátem odpařením etylacetátového roztoku, vzetím suchého zbytku do vodného metanolu, odtučněním rovnoměrným násobným protiproudovým rozdělením a odpařením tuku prostého metanolickeho roztoku ve vakuu k suchu se získá 70 až 80% polyhydroxyfenylchromanonová směs (silymarin I-IV). Poměr silymarinu I-III se pohybuje při 3:1:1; obsah silymarinu IV, taxifolinu činí asi 2 až 3 % celkového podílu silymarinu.

223986

Jako další stav techniky je zapotřebí uvést německý zveřejňovací spis č. 2 020 407. Způsob tohoto zveřejňovacího spisu se zabývá izolací silymarinu bez předchozího odtučnění pomocí celkové extrakce "směsí rozpouštědel alkohol-voda-ester nižší mastné kyseliny nebo uhlovodík" a oddělení tukových podílů "pomocí následného oddestilování 10 až 40 % objemu získaného extrakčního roztoku, následného odstavení a odstranění tuku usazeného nahoře". Podle přihlášky vede tento způsob jenom ke 40% silymarinovému extraktu; patentová přihláška doporučuje dále překrystalování z metanolu, avšak bez dalších údajů o podrobnosti způsobu. Při pokusu o reprodukci tohoto způsobu byl tento způsob shledán nereprodukovatelným a v konečném produktu zůstalo asi 13 % původního tuku.

Z německého zveřejňovacího spisu č. 2 017 789 je znám další způsob provedení. Konečné produkty podle tohoto způsobu mají obsahovat 40 až 70 % silymarinu a výtěžek konečného produktu činí 0,8 až maximálně 2,4 % (při 40% silymarinu). Jeho reprodukce ukázala, že tento způsob je rovněž nereprodukovatelný.

Do stavu techniky patří dále francouzský patentový spis č. 7 214 042, který se týká výroby extraktu z ostropestřce mariánského, aniž by bylo provedeno odtučnění. Udává se, že konečný produkt obsahuje asi 82 % polyhydroxyfenylchromonů; silymariny mají činit 50 % z udávaných 82 %. Je k tomu zapotřebí poznamenat, že silymarin je přiřazen jiné skupině sloučenin a sice polyhydroxyfenylchromanonům, nikoliv však polyhydroxyfenylchromonům. Rovněž tento způsob není reprodukovatelný.

Způsob podle německého vykládacího spisu č. 1 923 082 se nepodařilo dosud podstatně zlepšit. Potiže spočívají jednak v oddělení účinných látek z drogy za uchování existující směsi silymarinů a jednak v jejím oddělení od asi 30 % mastných olejů a těžce odstranitelných doprovodných látek. Tyto potiže byly překonány německým vykládacím spisem č. 1 923 082 jen zčásti.

Protože silymarin je cenné jaterní terapeutikum, existuje potřeba pokud možno vysoce koncentrovaného silymarinu, která je však nad hranicemi stávajícího stavu techniky.

Úkolem vynálezu je vytvořit nový způsob získávání čistého silymarinu (silymarinu I-IV), který je dalece prostý doprovodných látek a obsahuje všechny přirozené izomery. Tento nový způsob má vést jednoduše k velice čistému produktu a vyšším výtěžkům.

Překvapivě byl nalezen způsob, který odstraňuje nevýhody známých způsobů a vede hospodárně k čistému silymarinu (silymarinu I-IV) (čistota 90 až 96 %).

Způsob získávání silymarinu (silymarinu I-IV), při němž se plody ostropestřce mariánského zbavují větší části mastného oleje lisováním za studena, vylisovaná masa se rozdrobí, zbytek po lisování se extrahuje etylacetátem a zpracuje se, vyznačuje se tím, že

a) zbytek po vylisování se extrahuje dvakrát až čtyřikrát, s výhodou třikrát, vždy po dobu 0,5 až 1,5, s výhodou po dobu 1 hodiny bezvodým etylacetátem při teplotě 65 až 76 °C, s výhodou při teplotě 75 °C, v poměru 1:8 až 1:12, s výhodou 1:10 za intenzivního míchání a extrahovaná droga se oddělí.

b) buď se spojené etylacetátové roztoky odpaří při teplotě 40 až 55 °C, s výhodou při teplotě 50 °C ve vakuu 1,5 kPa, zbytek po odpaření a) se odtuční trojnásobnou desetiminutovou až dvacetiminutovou, s výhodou patnáctiminutovou extrakcí pevná hmota-kapalina pomocí petroléteru o rozmezí teploty varu 60 až 70 °C v poměru 1:15 až 1:25, s výhodou 1:20, nebo

bb) zbytek po odpaření a) se rozpustí v šestinásobném až desetinásobném, s výhodou osminásobném hmotnostním množství metanolu, nerozpuštěné zbylé podíly se oddělí, odtuční se trojnásobnou desetiminutovou až dvacetiminutovou, s výhodou patnáctiminutovou extrakcí pevná hmota-kapalina petroléterem (o rozmezí teploty varu 60/70 °C), v poměru 1:1,5 až 1:2,5, s výhodou 1:2,

c) buď se odtučněný zbytek b) rozpustí v šesti- až desetinásobném, s výhodou v osminásobném hmotnostním množství metanolu a zbylé nerozpustné podíly se oddělí, nebo

cc) odtučněný metanolický roztok bb) se oddělí od petroléteru,

d) metanolicnému roztoku c) nebo cc) se přidá vždy ve stejných objemech chloroform a voda a směs se intenzívně míchá po dobu asi 15 minut a dekantuje se,

e) chloroformová fáze se smísí pětkrát s metanolem a vodou v objemovém poměru 1:1:1, vždy asi po dobu 15 minut za intenzívního míchání a potom se chloroformová fáze oddělí,

f) spojené metanolicke fáze se odpaří při teplotě 40 až 50 °C, s výhodou při teplotě 40 °C ve vakuu 1,5 kPa,

g) odpařený zbytek se suspenduje v metanolu v poměru 1:4 až 1:6, s výhodou 1:5 a suspenze se vmíchá do osminásobného až dvanáctinásobného, s výhodou do desetinásobného objemového množství vody, po odstředění se sraženina promyje několikrát vodou,

h) sraženina se suší po dobu 20 až 30, s výhodou po dobu 24 hodin při teplotě 30 až 50 °C, s výhodou při teplotě 40 °C ve vakuu 1,0 kPa, potom se rozele a rozemletý produkt se případně dosuší při teplotě 30 až 50 °C, s výhodou při teplotě 40 °C ve vakuu 1,0 kPa.

Produkty izolované tímto způsobem mají obsah silymarinu (silymarinu I-IV) 90 až 96 %, vztaženo na bezvodou látku.

Z technického hlediska provádění způsobu podle vynálezu jsou jednotlivé kroky a specifická opatření voleny tak, že se prakticky izoluje dokonale v droze obsažená směs účinných látek. Dojde-li k odchylce těchto způsobů provedení, jedna nebo druhá sloučenina by byly ztraceny zcela nebo parciálně. Tato potřeba vzrůstá se stupněm obohacení této směsi účinných látek, zejména u pokročilých stupňů způsobu provedení, protože požadované účinné látky se mohly parciálně jako jednotlivé sloučeniny nebo jako celková směs s oddělovanými doprovodnými látkami vymknout získání.

Způsob podle vynálezu bere tyto skutečnosti v úvahu, takže vede k čistému produktu v optimálním výtěžku za udržení poměru izomerů, který je v droze.

Překvapivě jenom nalezenou kombinací opatření způsobu podle vynálezu, určitých rozpouštědel, případně rozpouštědlových systémů a dodržení fyzikálních, případně chemických podmínek se dospěje k vhodnému produktu.

Lisováním za studena plodů ostropestřce mariánského se zabráni chemickému odbourání nebo polymeraci silymarinu a zabráni se vzniku inertní emulze silymarinu a doprovodných látek v mastném oleji, což by mohlo být nevýhodné pro následující dělení. Lisováním se droga částečně odtuční. Vylisuje se asi 25 až 30 % oleje.

Opatření jemného rozemletí umožňuje rychlou následující extrakci, protože extrakční prostředek může pronikat snadněji do částic drogy.

Při tomto způsobu je rozhodující, že etylacetátová extrakce se provádí pomocí bezvodého etylacetátu. Obsah vody může být maximálně 0,5 %. Překročí-li obsah vody 0,5 %, nelze již v následujících stupních provedení oddělit více doprovodné látky. Tato překvapující skutečnost je v kombinaci s ostatními opatřeními způsobu podle vynálezu rozhodující pro úspěch způsobu, totiž získávání čistého silymarinu.

Poměr droga/rozpouštědlo při etylacetátové extrakci 1:8 až 1:12, s výhodou 1:10 je volen tak, že zajišťuje bez zbytečného přebytku specifické rozpuštění silymarinu. Dvojná-

sobná až čtyřnásobná, s výhodou trojnásobná extrakce dovoluje dokonalé získání silymarinu z drogy. Teploty v rozmezí 60 až 80 °C, s výhodou 75 °C je příznivá pro dobré rozpouštění účinných látek, současně nevede k rozkladným zjevům zde přítomných chemických sloučenin.

Vymíchání pomocí účinného míchadla přináší s sebou mechanické nakypření drogy, což umožňuje extrakci. Zvolený krátký čas u každé z více extrakcí od 0,5 až 1,5, s výhodou 1 hodiny nicméně dovoluje vyčerpávající extrakci.

Spojené etylacetátové extrakty se odpaří šetrně při nízké teplotě ve vakuu.

Následující několikanásobné odtučnění pevná hmota-kapalina petroléterem při poměrně vysokém poměru zbytku k petroléteru, například 1:20 má tu výhodu, že v krátké době a bez většího nákladu na zařízení oddělí vyčerpávajícím způsobem mastný olej. Podle volby lze zbytky po odpaření rozpustit asi v osminásobném hmotnostním množství, nerozpouštěné podíly oddělit a potom provést několikanásobnou extrakci pevná hmota-kapalina petroléterem v poměru asi 1:2. Výsledky jsou prakticky stejné.

Metanol jako poměrně levné rozpouštědlo je vhodný k rozpouštění odtučněného zbytku a je vhodný zejména pro svou velikou solvatační schopnost. Silymarin (silymarin I-IV) se v něm poměrně dobře rozpouští. Vysoký poměr zbytek/rozpouštědlo je výhodný k tomu, aby silymarin (silymarin I-IV) byl dokonale vyňat. Ve zbytku nezůstává žádný silymarin.

Nové a obzvláště intenzivní je použití chlorovaných, organických rozpouštědel, zejména na chlorem substituovaných nižších alkanů, jako chloroformu, metyléenchloridu, 1,2-dichloroetanu, s výhodou chloroformu k oddělení ještě zbylých doprovodných látek silymarinu (silymarin I-IV), aniž silymarin utrpí vcelku nějakou ztrátu a přičemž nedochází ke ztrátě izomerů. Přitom dochází k oddělení dalších lipofilních doprovodných látek, které nejsou vylučovány v odtučňovacím stupni spolu s olejem a petroléterem, jakož dalších méně polárních doprovodných látek, které byly sice nejprve rozpouštěny v metanolu, ale chovají se odpovídajícím způsobem v rozdělovacím fázovém systému. Rozpouštěcí rovnováha - stavový diagram zvoleného rozpouštědlového systému - jak ve druhu, tak ve množství, v tomto případě metanol-voda-chloroform 1:1:1 je zejména vhodný v přítomnosti silymarinu (silymarinu I-IV) a přítomných doprovodných látek, protože se dosahuje tímto rozpouštědlovým systémem dobrého rozdělení na dvě fáze. Odměšovací oblast stavového diagramu zachycuje udané poměry rozpouštědel.

Rozdělovací koeficient silymarinu (silymarin I-IV) mezi oběma fázemi je velice vysoký. Po provedených šesti výtřepcích v systému metanol/chloroform/voda 1/1/1 (obj./obj./obj.) vychází poměr silymarinu ve spojených vodně metanolicích fázích k silymarinu zbylému v chloroformové fázi jako 13:1.

Tím lze prakticky získat všechny silymarin (silymarin I-IV) z metanolicke fáze.

Vynálezem se překvapivě dosáhlo, že silymarin I-IV zůstávají ve vodně metanolicke fázi i jako jednotlivé sloučeniny podílově, takže zůstává zachován poměr izomerů.

Vodně metanolicke fáze se odpaří šetrně za nízké teploty a za vakua k suchu a zbytek se suspenduje několikrát do vody, za účelem promytí. Tento postup promytí se ukázal být vhodným k odstranění oklúze způsobené nečistotami produktu, ke které dochází při obvyklé filtraci.

Ve srovnání se stávajícím stavem techniky má způsob podle vynálezu výhodu, že vede jednoduchým způsobem k 90 až 96 % čistému silymarinu (silymarinu I-IV), při výtěžku ~ 1,7 %. Jenom kombinace zvolených opatření podle vynálezu za použití bezvodého etylacetátu a chlorem substituovaného alkanu, jako chloroformu, vede překvapivě k získání velice čistého silymarinu z plodů ostropestřce mariánského.

Efekt bezvodé etylacetátové extrakce drogy je třeba vyzvednout jako obzvláště inventivní. Hydrofilní látky zůstávají takto ve zbytku. Při následujících stupních způsobu provedení jako dělení v rozpouštědlech nelze již tyto hydrofilní doprovodné látky více oddělit od silymarinu.

Dále, zvláště překvapivý je dělicí účinek rozpouštědel typu chlorovaného nižšího alkanu, zejména chloroformu ve druhé fázi způsobu v důsledku specifické selektivity, přičemž prakticky se odstraní všechny doprovodné látky nacházející se ještě v tomto stupni provedení, takže silymarin zůstává v metanolicím roztoku velice čistý.

P ř í k l a d 1

K 300 kg jemně rozemletých a za studena lisovaných plodů pestřce mariánského se přidá 3 000 litrů bezvodého etylacetátu a zahřeje se na teplotu 75 °C. Při této teplotě se směs míchá intenzivně po dobu 1 hodiny pomocí výkonného míchadla. Potom se odfiltruje a zbytek drogy se ještě extrahuje dvakrát etylacetátem, jak je to popsáno.

Spojené, vyčárené etylacetátové roztoky se odpaří při teplotě 50 °C ve vakuu při 1,5 kPa do sucha. K odtužení se zbytek při teplotě místnosti vymíchá třikrát vždy 300 litry petroléteru o teplotě varu 60 až 70 °C po dobu 15 minut a potom se zbaví ve vakuu rozpouštědla. Takto získaný surový produkt se vezme do čtyřnásobného množství metanolu, přičemž pevná látka nepřecházející do roztoku se odstředí, dvakrát se promyje polovinou zmíněného množství metanolu a konečně, protože prakticky neobsahuje žádný silymarin, se oddělí.

K spojeným metanolicím roztokům se přidá nejprve chloroform, potom voda v objemovém poměru 1:1:1 a převede se do dekantčního zásobníku.

Po 15minutovém intenzivním míchání a dosaženém dělení fází se spodní fáze (chloroformová fáze) oddělí a ještě se extrahuje pětkrát v objemovém poměru 1:1:1 směsí metanol-voda. Potom se chloroformová fáze oddělí.

Spojené metanolicí fáze se odpaří při teplotě 50 °C ve vakuu 1,5 kPa a zbytek se suspenduje v pětinašobném množství metanolu. Suspenze se přidá tenkým proudem do desetinašobného objemového množství vody za míchání a potom se intenzivně míchá po dobu 15 minut. Potom se odstředí a zbytek v odstředivce se promyje opakovaně vodou za vzniku suspenze. Produkt se suší v sušárně po dobu 24 hodin při teplotě 40 °C, rozemele a dalších 48 hodin se suší při teplotě 40 °C.

Získá se světle zbarvený prášek, který obsahuje 90 až 96 % silymarinu (stanoveného metodou za použití 2,4-dinitrofenylhydrazinu [DNF-metoda] analogicky, jako se stanoví silymarin v plodech ostropestřce mariánského DAB VII, vydání 1968, 2. dodatek, 1975, str. 198, jakož po kvantitativním vyhodnocení remizních křivek). Průkaz identity byl proveden pomocí chromatografie na tenké vrstvě. Vzájemný poměr jednotlivých izomerů byl určen kvantitativním vyhodnocením remizních křivek (viz obr.). Výtěžek činí 4,9 kg ~ 1,7 %, vztaženo na suchou drogu.

P ř í k l a d 2

Ke 300 kg jemně rozemletých, za studena vylisovaných plodů ostropestřce mariánského se přidá 3 000 litrů bezvodého etylacetátu a vše se zahřeje na teplotu 75 °C. Při této teplotě se směs intenzivně míchá po dobu 1 hodiny pomocí výkonného míchadla. Potom se zfiltruje a zbytek drogy se extrahuje dvakrát popsáním způsobem.

Spojené, vyčerené etylacetátové roztoky se odpaří při teplotě 50 °C ve vakuu 1,5 kPa k suchu.

Zbytek po odpaření se rozpustí ve 120 litrech metanolu. Metanolickeý roztok se podrobí třikrát během 15 minut extrakci pevná-hmota-kapalina 135 litry petroléteru.

K metanolickeému roztoku se přidá nejprve chloroform, potom voda v objemovém poměru 1:1:1 a roztok se převede do dekantačního zásobníku.

Když byla směs intenzívně míchána po dobu 15 minut a je dosaženo oddělení fází, se spodní (chloroformová fáze) oddělí a extrahuje pětikrát v objemovém poměru 1:1:1 směsí metanol-voda po dobu 15 minut. Potom se oddělí chloroformová fáze.

Spojené vodné metanolickeé fáze se odpaří při teplotě 50 °C ve vakuu 1,5 kPa a zbytek se suspenduje v pětinasobném množství metanolu. Suspenze se přidá tenkým proudem do desetinásobného objemového množství vody za míchání a potom se ještě míchá po dobu 15 minut. Potom se odstředí a zbytek na odstředivce se promyje několikrát vodou za tvorby suspenze. Produkt se suší po dobu 24 hodin při teplotě 40 °C v sušárně a dosuší se po dobu dalších 48 hodin při teplotě 40 °C.

Způsob vede k 90 až 96 % silymarinu stejných vlastností jako v příkladu 1.

P ř í k l a d 3

Stejný způsob provedení za použití metylénchloridu namísto chloroformu vede k 90 až 94% silymarinu. Výtěžek činí 1,7 %.

P ř í k l a d 4

Stejný způsob provedení za použití 1,2-dichlorethanu místo chloroformu vedou k 90 až 93% silymarinu. Výtěžek činí 1,8 %.

Platné pro všechny příklady:

Procenta čistoty a malé změny týkající se výtěžku závisí na droze.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob získávání silymarinu, tedy silymarinu I-IV, při němž se plody ostropestřce mariánského zbavují větší části mastného oleje lisováním za studena, vylisovaná masa se rozdrobí, zbytek po lisování se extrahuje etylacetátem, etylacetátový extrakt se odpaří a zpracuje, vyznačující se tím, že

a) zbytek po vylisování se extrahuje dvakrát až čtyřikrát, s výhodou třikrát, vždy po dobu 0,5 až 1,5, s výhodou po dobu 1 hodiny bezvodým etylacetátem při teplotě 65 až 76 °C, s výhodou při teplotě 75 °C, v poměru 1:8 až 1:12, s výhodou 1:10 za intenzívního míchání a extrahovaná droga se oddělí,

b) buď se spojené etylacetátové roztoky odpaří při teplotě 40 až 55 °C, s výhodou při teplotě 50 °C ve vakuu 1,5 kPa, zbytek po odpaření a) se odtuční trojnásobnou desetiminu-

ovou až dvacetiminutovou, s výhodou patnáctiminutovou extrakcí pevná hmota-kapalina pomocí petroléteri o rozmezí teploty varu 60 až 70 °C v poměru 1:15 až 1:25, s výhodou 1:20, nebo

bb) zbytek po odpaření a) se rozpustí v šestinásobném až desetinasobném, s výhodou osminásobném hmotnostním množství metanolu, nerozpuštěné zbylé podíly se oddělí, odtuční se trojnásobnou desetiminutovou až dvacetiminutovou, s výhodou patnáctiminutovou extrakcí pevná hmota-kapalina petroléteri o rozmezí teploty varu 60 až 70 °C, v poměru 1:1,5 až 1:2,5, s výhodou 1:2.

c) buď se odtučený zbytek b) rozpustí v šestinásobném až desetinasobném, s výhodou osminásobném hmotnostním množství metanolu a zbylé nerozpustné podíly se oddělí, nebo

cc) odtučený metanolický roztok bb) se oddělí od petroléteri,

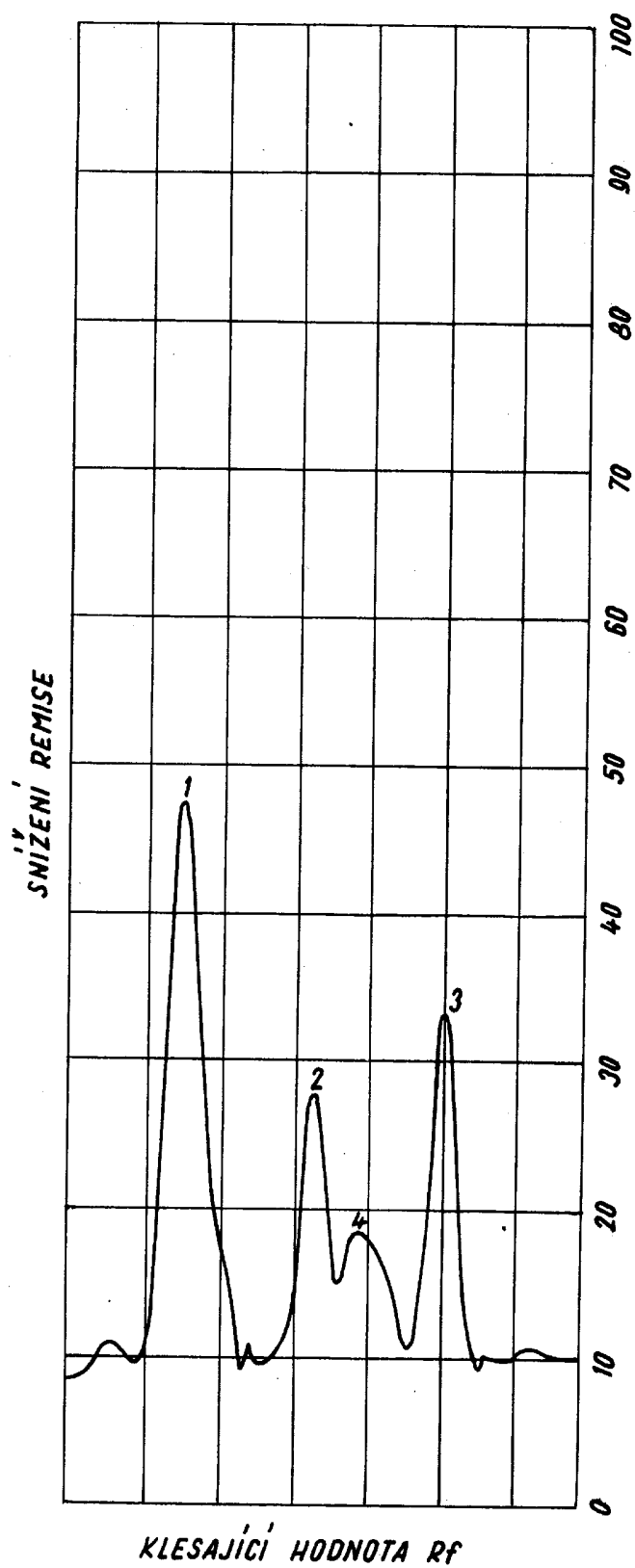
d) k metanolickému roztoku c) nebo cc) se přidá vždy ve stejných objemech chloroform a voda a směs se intenzívně míchá po dobu 15 minut a dekantuje se,

e) chloroformová fáze se mísí pětkrát s metanolem a vodou v objemovém poměru 1:1:1, vždy po dobu 15 minut za intenzívního míchání a potom se chloroformová fáze oddělí,

f) spojené metanolické fáze se odpaří při teplotě 40 až 50 °C, s výhodou při teplotě 40 °C ve vakuu 1,5 kPa,

g) odpařený zbytek se suspenduje v metanolu v poměru 1:4 až 1:6, s výhodou 1:5 a suspenze se vmíchá do osminásobného až dvanásobného, s výhodou do desetinasobného objemového množství vody, po odstředění se sraženina promyje několikrát vodou,

h) sraženina se suší po dobu 20 až 30, s výhodou po dobu 24 hodin při teplotě 30 až 50 °C, s výhodou při teplotě 40 °C ve vakuu 1,0 kPa, potom se rozele a rozemletý produkt se případně dosuší při teplotě 30 až 50 °C, s výhodou při teplotě 40 °C ve vakuu 1,0 kPa.



1 SILYBIN
2 SILYDIANIN
3 SILYCHRISTIN
(4 TAXIFOLIN)

VLNOVÁ DÉLKA PŘI
288 nm