

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 166363 B

Patentdirektoratet  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 5842/85

(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 3445950

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

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

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

(54) Fremgangsmåde til isolering af lysophospholipidfrit phosphatidylcholin fra æggepulver

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

5842-85

Fremgangsmåde til isolering af lysophospholipidfrit phosphatidylcholin fra æggepulver ved hvilken man ekstraherer æggepulveret med en opløsningsmiddelblanding af en lavtkogende petroleums-etherfraktion (40-80°C), en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lavere alkanol og vand, kommer ekstraktfasen 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 rent phosphatidylcholin i hovedløbet.

DK 166363 B

Den foreliggende opfindelsen angår en særlig fremgangsmåde til isolering af højrent 1,2-diacyl-glycero-3-phosphocholin (phosphatidylcholin), som er frit for lysophospholipider, ved ekstraktion af æggepulver og efterfølgende chromatografi af den fremkomne æggepulverekstraktopløsning på silicagel.

Phospholipider finder blandt andet anvendelse inden for levnedsmiddelindustrien, til dyreernæring, til kosmetik og inden for farmacien. Inden for farmacien anvendes rent phosphatidylcholin som aktivt stof og som hjælpestof, for eksempel som emulgator ved fremstilling af fedtemulsioner til parenteral applikation samt til fremstilling af liposomer. Specielt til den parenterale anvendelse anvendes overvejende æggephosphatidylcholin, som skal være frit for hæmolytisk virkende lysophospholipider.

Ved fremstilling eller udvinding af æggephospholipider går man ud fra rå æggeblomme, der ca. har følgende sammensætning:

- 50 % vand
- 31 % æggelipider
- 16 % proteiner
- 3 % askebestanddele

Æggelipidandelen består af neutrallipider (triglycerider, kolesterol og lignende) og phospholipiderne. Isoleringen af æggelipidandelen sker ved direkte ekstraktion af æggeblommen for eksempel med dimethylether (DE-PS 28 33 371) eller ved ekstraktion af den tørrede æggeblomme (æggeblommepulver).

Til udvinding af phospholipiderne anvendes fortrinsvis den tørrede æggeblomme der ca. har følgende sammensætning:

- 31 % proteiner
- 50 % triglycerider/cholesterol
- 18 % phospholipider

Phospholipiderne udvindes fortrinsvis ved ekstraktion med petroleumsether, ether, chloroform, methanol eller ethanol og udfældning med acetone: USP 20 13 804, DE-PS 260 886, DE-PS 261 212, DE-PS 272 057, DE-PS 487 335, Jap Koka; 7961200. Phospholipidandelen består ifølge K. Orsinger, Seifen-Öle-Fette-Wachse 109, 495-499 (1983) af:

	73 % phosphatidylcholin	(PC)
	5-6% lysophosphatidylcholin	(LPC)
	15 % phosphatidylethanolamin	(PE)
5	2-3% lysophosphatidylethanolamin	(LPE)
	1 % phosphatidylinosit	(PI)
	2-3% sphingomyelin	(SHA)
	1 % plasmalogen	(PLA)

10 Denne phospholipidblanding betegnes også rent æggelecithin, P.H. List et al., Pharmazeutische Verfahrenstechnik heute 1 (7) 1-8 (1980). Dette æggelecithin finder anvendelse inden for næringsmiddelindustrien og farmacien.

Adskillelsen af denne phospholipidblanding i de enkelte phospholi-  
 15 pider er meget bekostelig og gennemføres derfor ikke i stor målestok, selv om specielt rent lysophospholipidfrit phosphatidylcholin ville være ønskværdigt navnlig til anvendelse inden for farmacien. Der kendes en række bekostelige laboratoriemetoder til udvinding af rent phosphatidylcholin. Således fås lysophosphatidylcholinfrit phosphatidylcholin ifølge  
 20 M. Marsh et al., Clinica Chimica Acta 43, 87-90 (1973) via en bekostelig dobbelt søjlechromatografi, ved hvilken der blandt andet gennemføres en gradienteluering, hvortil der benyttes opløsningsmiddelblandinger, som er toksikologisk betænkelige inden for farmacien såsom chloroform/methanol. Genvinding af opløsningsmidlerne er umulig (azeotrope blandinger).

25 N.S. Radin, J. Lipid Res. 13, 922-924 går ud fra æggelecithin. Æggelecithinet opløses i ethanol og sættes til en aluminiumchromatografisøjle og elueres med ethanol, hvorved phosphatidylethanolamin fraskilles. Det inddampede eluat, som indeholder phosphatidylcholin, lysophosphatidylcholin, sphingomyelin og neutrallipider, opløses i en opløsnings-  
 30 middelblanding af hexan, isopropanol og vand og sættes til en SiO<sub>2</sub>-søjle og elueres med samme opløsningsmiddelblanding, hvorved der kan opnås et udbytte på 40-43%. Der opnås således et phosphatidylcholin med ringe foreninger af lysophosphatidylcholin og sphingomyelin, men dette er kun muligt via en bekostelig fremgangsmåde med fire trin og dertil kun med  
 35 fire forskellige opløsningsmidler eller opløsningsmiddelblandinger. Desuden er phosphatidylcholinvirkningsgraden ved denne fremgangsmåde kun 44% beregnet i forhold til det anvendte æggepulver.

Den foreliggende opfindelse har som formål at udvikle en simpel

fremgangsmåde til isolering af lysophospholipidfrit phosphatidylcholin med høj renhed direkte fra æggepulver.

Det har nu overraskende vist sig, at man kan udvinde lysophospholipidfrit phosphatidylcholin i høj renhed ved ekstraktion af æggepulver med en opløsningsmiddelblanding af petroleumsether, 2-propanol og vand og efterfølgende silicagelsøjlechromatografi af ekstrakten med samme opløsningsmiddelblanding.

Den foreliggende opfindelse angår i overensstemmelse hermed en særlig fremgangsmåde til isolering af lysophospholipidfrit phosphatidylcholin fra æggepulver, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man ekstraherer æggepulveret med en opløsningsmiddelblanding af en lavkogende petroleumsetherfraktion (kogepunkt 40-80°), en C<sub>1-4</sub> lavmolekylær alkohol og vand, kommer ekstraktfasen på en med silicagel fyldt søjle ved en temperatur i området fra 20-50°C, ved denne temperatur eluerer med samme opløsningsmiddelblanding og derved i hovedløbet opnår et lysophospholipidfrit phosphatidylcholin. I forløbet opfanges blandt andet triglycerider, kolesterol og phosphatidylethanolamin, i hovedløbet phosphatidylcholin og i efterløbet lysophosphatidylcholin og sphingomyelin. Fra forløbet kan phosphatidylethanolamin isoleres i ren form ved hjælp af kendte fremgangsmåder.

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

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen udføres ved en temperatur i området fra 20-50°C, fortrinsvis 20-25°C, og kan udføres ved normaltryk eller ved overtryk.

En ganske speciel fordel ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen består i, at man hele tiden kan genanvende silicagelen efter udført chromatografi. Samtlige forureninger opsamles enten i forløbet eller i efterløbet. Der kan endda ses bort fra efterløbet, da de i søjlen værende forureninger ved fornyet belastning af denne vil blive elueret i det næste forløb.

En yderligere fordel ligger i anvendelsen af kun én, let gendestillerbar opløsningsmiddelblanding til ekstraktionen og den søjlechromatografiske adskillelse.

I sammenligning med kendte fremgangsmåder udmærker den nye fremgangsmåde sig ved en væsentligt simplere fremgangsmåde. Phosphatidylcho-

linet udvindes med en virkningsgrad på 92% i forhold til æggepulveret. Ved en søjlechromatografisk adskillelse med 200 g silicagel adskilles 90 g æggelipid, hvorved der kun kræves et samlet eluat på 4,2 l. Fremgangsmåden har snarere karakter af en filtrering end af en søjlechromatografisk rensning i sædvanlig forstand.

Opfindelsen belyses nærmere i det efterfølgende eksempel nr. 1. Eksempel 2 og 3 er sammenligningseksempler.

#### Analysemetode

Phosphatiderne analyseredes ved hjælp af tyndtlagschromatografi. Olieindholdet blev sat lig med den dialyserbare andel.

#### Søjlechromatografi, opløsningsmiddelblanding

Der anvendtes en chromatografisøjle med en indvendig diameter på 4,5 cm og en højde på 37 cm.

Søjlen fyldtes med en opslæmning af 200 g silicagel (Merck) i en opløsningsmiddelblanding af letbenzin (65-73°C)/2-propanol/vand i volumenforholdet 1/1/0,175. Samme opløsningsmiddelblanding anvendtes til ekstraktionen af æggepulveret og til elueringen. Efter udført chromatografi kan silicagelen benyttes igen.

#### Udgangsmateriale

Der anvendtes en sædvanlig æggepulverhandelsvare med følgende sammensætning:

25	11 %	phosphatidylcholin
	4 %	sphingomyelin
	3 %	phosphatidylethanolamin
	1,5 %	lysophosphatidylcholin
30	0,5 %	andre phospholipider
	48 %	neutrallipider/cholesterol
	32 %	proteiner

#### Eksempel 1

35

##### 1. trin

150 g æggepulver røres sammen med 300 ml opløsningsmiddelblanding i 10 minutter ved 40°C. Proteinerne frasuges og eftervaskes med lidt op-

Løsningsmiddelblanding. Der opnås 300 ml filtrat med 90 g æggelipider.

## 2. trin

Filtratet kommes på en med silicagel (200 g) fyldt søjle og elueres med samme opløsningsmiddelblanding ved stuetemperatur.

Det samlede eluat (5 l) inddelles i 3 fraktioner. Fraktionerne indampes, og remanenserne analyseres.

1. Fraktion 0-1,6 l      Remanens: 69 g  
indeholder neutrallipider (inklusive kolesterol),  
PE, LPE, PI, spor af PC og spor af SPH
  
2. Fraktion 1,6 l - 4,2 l      Remanens: 16,1 g  
PC-indhold:                      94 %  
SPH-indhold:                    <2 %  
LPC-indhold:                    ≤0,3 %  
Olieindhold:                    ≤0,5 %  
Rest:                              Lipider, vand etc.  
PC-virkningsgrad:              92 % af det teoretiske beregnet ud  
fra æggepulveret
  
3. Fraktion 4,2-5,0 l      Remanens: 4 g  
indeholder SPH, LPC og spor af PC

Efter udtagning af den 2. fraktion kan der på ny tilsættes æggelipider, hvorved produkterne i 3. fraktion elueres sammen med produkterne i 1. fraktion.

## Eksempel 2 (sammenligningseksempel)

30

### 1. trin

Fremgangsmåde ifølge Japan kokai 7961200.

150 g æggepulver røres sammen med 1350 ml 95%-ig ethanol ved stuetemperatur. Efter frafiltrering af de uopløselige bestanddele og vask med 95%-ig ethanol indampes de samlede ethanolfiltrater.

35

	faststofudbytte:	36 g æggelipider
	phosphatidylcholin-indhold:	42 %
	sphingomyelin-indhold:	3 %
	lysophosphatidylcholin-indhold:	2 %
5	phosphatidylethanolamin-indhold:	8 %
	rest: triglycerider, kolesterol etc.	

### 2. trin ifølge DE-OS 30 47048

Der gennemføres en søjlechromatografi (100 g silicagel) ved 65°C  
10 under anvendelse af ethanol som elueringsmiddel.

Søjletilsætning: 36 g æggelipider i 500 ml 95% i ethanol

Elueringsmiddel: 1) 95%-ig ethanol til 1,7 l førsteeluat  
15 2) 80%-ig ethanol til 1,2 l andeteluat

Efter 1,7 l førsteeluat opsamles 1,2 l andeteluat. Det andet eluat  
inddampes og analyseres.

20	faststofudbytte:	10,4 g
	phosphatidylcholin-indhold:	85 %
	sphingomyelin-indhold:	6 %
	lysophosphatidylcholin-indhold:	5 %
	olieindhold:	0,5%
25	rest: vand, ethanol etc.	
	phosphatidylcholinvirkningsgrad:	54% af det teoretiske be- regnet ud fra æggepulveret

### 3. trin

30 Søjlen må før genanvendelse bringes i ligevægt med 96%-ig ethanol.

### Eksempel 3

#### Sammenligningseksempel

Fremgangsmåde ifølge N.S. Radin, J. Lipid Res. 19, 922-924 (1978).

35

### 1. trin

150 g æggepulver ekstraheres med 1,35 l 95%-ig ethanol ved stuetem-  
peratur, og ekstrakten frafiltreres og inddampes. Der opnås 36 g rå æg-

gelecithin med følgende sammensætning:

	42 %	phosphatidylcholin
	8 %	phosphatidylethanolamin
5	2 %	lysophosphatidylcholin
	3 %	sphingomyelin
	Rest:	triglycerider, cholesterol etc.

### 2. trin

10 10 g af dette ægelecithin opløses i absolut ethanol og underkastes en søjlechromatografi med 100 g  $Al_2O_3$ . Som elueringsmiddel anvendes absolut ethanol.

Eluatet inddampes, og der opnås en phospholipidblanding (5 g) med følgende sammensætning:

15	51 %	phosphatidylcholin
	3 %	lysophosphatidylcholin
	5 %	sphingomyelin
	rest:	neutrallipider, cholesterol etc.

20

### 3. trin

2,5 g af den efter det 2. trin udvundne phospholipidblanding opløses i 2,5 ml af en blanding af hexan/isopropanol/vand (1/1,3/0,2 på volumenbasis) og sættes til en med 100 g silicagel fyldt søjle. Efter til-

25 sætning af yderligere 100 ml af samme opløsningsmiddelblanding elueres der med 1,4 l af en blanding af hexan/isopropanol/vand (1/1,3/0,25 på volumenbasis). Efter forløbet (triglycerider/cholesterol) opfanges hovedløbet og inddampes.

30 Remanens: 1,1 g

Sammensætning:

	91 %	phosphatidylcholin
	2 %	sphingomyelin
	1 %	lysophosphatidylcholin
35	6 %	vand, restopløsningsmiddel, triglycerider
	PC-virkningsgrad:	44 % beregnet ud fra æggepulver

4. trin

Søjlen må, før den anvendes igen, bringes i ligevægt med hexan/isopropanol/vand (1/1,3/0,2 på volumenbasis).

- 5       Sammensætning:  
           Udgangsmateriale: æggepulver

	Eksempel 1	Eksempel 2	Eksempel 3
10			
Antal nødvendige trin før genanvendelse af silicagelen	2	3	4
PC-virkningsgrad beregnet i forhold til æggepulver:	92%	54%	44%
15			
Antal opløsningsmidler eller opløsningsmiddelblandinger:	1	2	4
PC-indhold:	94%	85%	91%
20			

- Som sammenligningen af eksemplerne viser, kan der ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen ved en simpel fremgangsmåde over 2 trin og med kun én opløsningsmiddelblanding udvindes phosphatidylcholin i højt udbytte og høj renhed.
- 25

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til isolering af lysophospholipidfrit phosphatidylcholin fra æggepulver, KENDETEGNET ved, AT man ekstraherer æggepulveret med en opløsningsmiddelblanding af en lavtkogende petroleumsetherfraktion (40-80°C), en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lavere alkanol og vand, kommer ekstraktfasen 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 lysophospholipidfrit phosphatidylcholin i hovedløbet.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, KENDETEGNET ved, AT man anvender en opløsningsmiddelblanding af letbenzin (65-73°C), propanol og vand.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, KENDETEGNET ved, AT man anvender en opløsningsmiddelblanding af en volumedel letbenzin (65-73°C), en volumedel 2-propanol og 0,175 volumendele vand.
4. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-3, KENDETEGNET ved, AT man gennemfører ekstraktionen i 10-20 minutter ved 20-50°C.
5. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, KENDETEGNET ved, AT man gennemfører søjlechromatografien ved 20-25°C.

25

A. Nattermann & Cie. GmbH  
ved  
TH. OSTENFELD PATENTBUREAU A/S

Birgitte Bagger-Sørensen

30

København, den 16. november 1992