



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

266 809

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
A 61 K 31/35

(21) PV 7053-87.N

(22) Přihlášeno 30 09 87

(40) Zveřejněno 12 05 89

(45) Vydáno 14 12 90

(75)

Autor vynálezu

MOURAL JAROSLAV ing., MAZAČ RUDOLF,
PROCHÁZKA VLADIMÍR RNDr. CSc., PRAHA

(54)

Způsob výroby krystalického silybinu

(57) Řešení se týká výroby krystalického silybinu z přírodní drogy, která se předem neodtučňuje a obsahuje ve svém silymarinovém komplexu alespoň 60 % hmot. silybinu spolu s isosilybinem. Výroba je založena na extrakci drogy 95% vodným acetonem, po zředění vodou se oddělí olejová fáze. Vodně acetonová fáze se zahustí, vzniklá suspenze surového silybinu se po úpravě chloridem sodným odtuční petroletherem a oddělený silybin se promyje chlorovaným uhlovodíkem. Tento surový silybin se překrystaluje z methanolu a dále ze směsi kyseliny octové, acetonu a vody. Získá se čistý krystalický silybin, který slouží jako léčivo při chorobách jater.

Vynález se týká způsobu výroby krystalického silybinu a získávání oleje extrakcí neodtučněných drcených plodů ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.), obsahujících komplex flavanolignanů (silymarin) s převahou více než 60 % silybinu spolu s isosilybinem.

Plody ostropestřce mariánského obsahují komplex flavonoidních látek odvozených od flavanonolu taxifolinu, nazvaný silymarin. Silymarin se používá řadu let jako cenné jaterní léčivo se stimulačním účinkem na metabolismus jaterních buněk a ochranným působením na jejich membrány (např. G. Vogel a sp.: *Arzneimittel-Forsch.* 25, 82, 1975). Hlavními složkami silymarinu jsou izomerní sloučeniny sumárního vzorce $C_{25}H_{22}O_{10}$ silybin (dříve silymarin I), silydianin (dříve silymarin II) a silychristin (dříve silymarin III), které jsou považovány za nositele účinku a působí synergicky (např. NSR pat. spis 1 923 081). Do dnešní doby byla dostatečně objasněna chemická struktura i stereochemie silybinu (A. Pelter a sp.: *Tetrahedron Letters* č. 25, 2 911, 1968; R. Hänsel a sp.: *Chem. Ber.* 108, 1 482, 1975; A. Arnone a sp.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* č. 16, 696, 1979), silydianinu (D. J. Abraham a sp.: *Tetrahedron Letters* č. 31, 2 675, 1970) i silychristinu (A. Pelter a sp.: *Tetrahedron Letters* č. 51, 4 547, 1977; H. Wagner a sp.: *Tetrahedron Letters* č. 4 381 1978). Rovněž byl odlišen silybin od svého polohového izomeru isosilybinu (A. Arnone a sp.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* č. 16, 696, 1979), který jej pravidelně provází v menším množství.

Při současném stavu techniky je ve světovém měřítku široce rozpracována průmyslová příprava silymarinu z odtučněné i neodtučněné drogy ostropestřce. Izolace silymarinu i jeho jednotlivých složek je přitom mimořádně ztížena vysokým obsahem oleje v droze, obtížnou difúzí flavanolignanů do extrakčního média a směsným charakterem silymarinu. Z řady patentově chráněných postupů izolace silymarinu jako celku byl nejvíce využíván původní postup podle NSR pat. spisu č. 1 923 082 (čs. AO č. 162 722). Podle tohoto postupu byl získáván amorfní silymarin o obsahu 70 až 80 % flavanolignanů s poměrem silybin:silydianin:silychristin v průměru 3:1:1 podle kvality výchozí drogy. Jako další lze uvést modifikovaný postup (NSR pat. spis č. 2 914 330, čs. AO č. 223 986), podle nějž se dosahuje v silymarinu obsahu 90 až 96 % flavanolignanů. V ČSSR je silymarin vyráběn původním postupem, jímž se dosahuje obsahu flavanolignanů 75 až 80 % (čs. AO č. 216 997).

Přestože je znám synergismus při hepatoprotektivním působení jednotlivých složek silymarinu, představuje silybin hlavní účinnou látku (G. Vogel a sp.: *Arzneimittel-Forsch.* 25, 82, 1975; H. P. Koch a sp.: *Arch. Pharm.* 314, 515, 1981). Vzhledem ke své malé rozpustnosti ve vodě a poměrně nízké biologické dostupnosti je silybin s výhodou chemicky obměňován na vodorozpustné deriváty, z nichž se ukazují jako optimální poloestery s dikarboxylovými kyselinami (H. P. Koch a sp.: *Arch. Pharm.* 316, 385, 1983; NSR pat. spis č. 1 963 318; NSR pat. spis č. 3 442 639). V poslední době začal být vedle silymarinu využíván též silybin v lékařské praxi a tím vzrostla potřeba hledat nové izolační postupy, umožňující získávat čistý silybin ekonomickým způsobem, využitelným v průmyslovém měřítku.

V tomto spise je pojem silybin definován nadále hlavní izomer z dvojice silybin - isosilybin. Vyizolovaným silybinem z drogy se tedy rozumí produkt, obsahující pouze příměs isosilybinu.

Dosavadní způsoby izolace silybinu jsou obtížné a jsou spojeny se značnými ztrátami. Závažným problémem je přitom vysoký obsah oleje v droze, který může činit až 30 % hmot., nepříznivý poměr jednotlivých složek silymarinu a někdy též vysoký obsah isosilybinu. Postupy podle pat. spisů NSR č. 1 923 082 a 2 914 330 jsou zaměřeny na přípravu silymarinového komplexu a jejich charakteristickým rysem je předběžné částečné odtučnění drogy lisováním, různě modifikovaná extrakce octanem ethylnatým a následné usilovné odtučňování koncentrovaného meziproductu. Výsledný silymarin má u obou postupů průměrný poměr (silybin + isosilybin):silydianin:silychristin 3:1:1, přičemž poměr silybin:isosilybin je asi 2:1. Izolace silybinu z tohoto komplexu o dosti nepříznivém složení je popsána v pat. spise NSR č. 3 537 656 (v ČSSR přihlášeno jako čs. AO č. 271 321). Silymarin se buď extrahuje octanem ethylnatým

nasyčeným vodou a tím se obohacuje o silybin, nebo se rozpustí v methanolu a po zahuštění krystaluje řadu dnů surový silybin. Ten se pak rekrystaluje buď ze směsi octan ethylnatý - methanol nebo z octanu ethylnatého s definovaným obsahem vody. Nevýhodou postupu je časová náročnost, práce s velkými objemy rozpouštědla a potřeba bezvodého octanu ethylnatého.

Vlastními pokusy bylo prokázáno, že u silymarinu obsahujícího do 60 % silybinu včetně příměsí isosilybinu je izolace silybinu v průmyslovém měřítku značně obtížná a nevýhody u popsáných postupů lze ztížit odstranit. Vzhledem k variabilitě produkční rostliny lze však docílit drogy s vyšším obsahem silybinu a v tomto případě bylo zjištěno, že lze překvapivě částečně využít způsobu extrakce drogy podle čs. AO č. 216 997. Podle tohoto postupu se drcená neodtučňovaná droga extrahuje za studena vodným acetonem o koncentraci acetonu 90 až 98 % obj. extrakt se zahustí na olejovitý odparek, který se převede do 60% vodného ethanolu a olej se odstraní opakovanou extrakcí petroletherem. Odtučňovaná vodná - ethanolická fáze se vyextrahuje chloroformem, chloroformová fáze obsahující silymarin se zahustí na sirup a z něj se sráží silymarin uváděním do nadbytku vody. Při aplikaci tohoto postupu u drogy bohaté silybinem bylo zjištěno, že již při částečném zahuštění extraktu a dosažení koncentrace acetonu asi 60 % začíná spontánně krystalovat silybin, který spolu s vyloučeným olejem vytváří složitou směs. Při odtučňování petroletherem vznikají stabilní emulze a oddělování fází je značně ztíženo. Z technologického hlediska nelze stávající postup používat ke zpracování drogy bohaté silybinem.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob výroby krystalického silybinu z přírodní neodtučňované drogy obsahující komplex flavanolignanů s obsahem alespoň 60 % hmot. silybinu včetně isosilybinu po extrakci drcené drogy 95% vodným acetonem podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se acetonový extrakt flavanolignanů zředí vodou, poté se oddělí spodní olejová vrstva a vodná acetonová fáze se zahustí. Vzniklá suspenze surového silybinu se vyextrahuje alifatickým uhlovodíkem nebo směsí alifatických uhlovodíků s 5 až 8 atomy uhlíku, potom se vodná suspenze upraví přidávkou chloridu sodného. Po oddělení filtrátu se surový silybin předsuší odvětráváním na obsah vody 15 až 20 % hmot. za případného promytí chlorovaným uhlovodíkem typu dichlormethan nebo chloroform. Po rozpuštění surového silybinu v acetonu a přefiltrování se acetonová fáze odpaří k suchu, odparek se za varu rozpustí v methanolu a po přidání 3 až 7 % obj. vody se ponechá krystalovat. Získaný silybin se rozpustí za varu v soustavě kyselina octová - aceton ve vzájemném objemovém poměru 3,5 až 4,0:6,5 až 6,0, poté se roztok přefiltruje s aktivním uhlím a čirý filtrát se po zahuštění na třetinu svého objemu zředí vodou v množství 5 % obj. vody na objem získaného koncentráту, načež se získaný čistý krystalický silybin oddělí.

Způsob podle vynálezu se provádí tak, že se drcená neodtučňovaná droga o obsahu 2,0 až 2,5 % silybinu extrahuje celkem 10 díly 95 až 98% obj. vodného acetonu při teplotě 20 až 25 °C, načež se v odděleném extraktu upraví přidávkou vypočteného množství vody koncentrace acetonu na hodnotu 92 % obj.. Stáním po dobu 15 až 24 hodin při teplotě 20 až 25 °C se při této koncentraci acetonu oddělí olejová vrstva jako spodní fáze, která se dá snadno oddělit. Tímto způsobem lze získat až 50 % oleje obsaženého ve výchozí droze. Po oddestilování acetonu za sníženého tlaku se získá kvalitní olej, neobsahující zbytkové rozpouštědlo. Vrchní vodná acetonová fáze se odpaří za sníženého tlaku asi na 1/15 původního objemu (aceton se regeneruje) a vznikne suspenze, obsahující ještě olej. Po přidávce chloridu sodného, který příznivě ovlivňuje strukturu suspenze, se systémem odtuční extrakcí petroletherem a odsátím se získá surový produkt, který se po částečném vysušení zbaví některých příměsí rozpouštěním v acetonu a filtrací. Odparek z acetonového čirého filtrátu se krystaluje z 95% vodného methanolu a získaný krystalický silybin se dále čistí rekrystalováním ze směsi kyselina octová - aceton - voda. Tímto způsobem se získá krystalický silybin obsahující méně než 1 % hmot. isosilybinu, ve výtěžku kolem 1,2 až 1,4 % hmotnosti výchozí drogy, tj. kolem 60 % analyticky zjištěného obsahu silybinu v droze.

Hlavní výhody postupu podle vynálezu spočívají v časové nenáročnosti, v nízké spotřebě surovin a v jednoduché technologii, která nevyžaduje nákladných zařízení. Odpadá nutnost

předběžného odtučňování drogy a jednotlivé čisticí stupně jsou účinné při minimální spotřebě organických rozpouštědel. Na rozdíl od octanu ethylnatého lze použítá rozpouštědla aceton a petrolether snadno a bez ztráty kvality regenerovat. Z nízké spotřeby rozpouštědel vyplývá i úspora energií v celém izolačním postupu i při jejich regeneraci. Postup umožňuje přípravu jak čistého krystalického silybinu, tak i kvalitního oleje bez zbytkového rozpouštědla. Realizace postupu podle vynálezu nezatežuje životní prostředí nežádoucími dopady. Získaný olej obsahuje esenciální nenasycené mastné kyseliny a je možno jej využít v kosmetice nebo v potravinářství.

V dalším je vynález blíže objasněn příklady provedení, aniž by se jimi omezoval.

P ř í k l a d 1

Navážka 5,0 kg hrubě drcených plodů ostropestřece mariánského o velikosti částic 0,5 až 2,0 mm se extrahuje protiproudě perkolací 95% vodným acetonem (obj.) tak, aby během 8 h proteklo náplní 5 l. Extrakt o objemu 50 l (10 dílů vztaženo na výchozí drogu) se upraví přidávkou vody na koncentraci acetonu 92 % obj. a po rozmíchání se ponechá stát 20 h při teplotě 20 až 25 °C. Po této době se vyloučí jako spodní fáze 550 ml olejové vrstvy. Jejím oddělením a odpařením acetonu za sníženého tlaku se získá 640 ml velmi čistého oleje. Extrakt oddělený od olejové vrstvy se zahustí za sníženého tlaku na objem 3 000 ml při teplotě lázně do 60 °C. Vzniklá suspenze se míchá s 3 000 ml petroletheru po dobu 30 minut a pak se ponechá v fázi oddělit. Z petroletherové fáze se regeneruje rozpouštědlo. Olejový zbytek obsahuje ještě petrolether a nepřipojuje se k prvnímu podílu oleje.

Odtučněná vodná suspenze se rozmíchá s přidávkou 150 g chloridu sodného. Po 30 minutách míchání vznikne dobře filtrovatelná suspenze, která se odsaje na nuči a promyje 3x100 ml vody. Produkt se suší volně odvětráváním 24 hodin při teplotě 25 °C.

Částečně vysušený produkt, obsahující 15 % vody, se promyje 2x250 ml dichlormethanu, pak se rozpustí v 1 000 ml acetonu a roztok se zfiltruje. Filtrát se odpaří za sníženého tlaku při vnitřní teplotě do 50 °C k suchu.

Podíly acetonu získané z destilací se spojí a po stanovení obsahu vody se upraví koncentrace acetonu na 95 % obj.. Regenerovaný aceton takto upravený se použije znovu k extrakci drogy.

Suchý odparek z acetonu se rozpustí za varu v 1 000 ml methanolu, přičemž část zůstane již při této operaci nerozpuštěna a je krystalická, vyhovující čistoty. K horké suspenzi se přidá 50 ml vody a směs se ponechá 20 h krystalovat při teplotě 20 až 25 °C. Poté se odsaje a promyje 50 ml 95% (obj.) vodného methanolu. Získá se 60 g prvního podílu silybinu. Zahuštěním matečných loughů na poloviční objem se získá 16 g druhého podílu. Odpařením matečných loughů k suchu, rozpuštěním odparku v 300 ml 95% (obj.) vodného methanolu za varu a ochlazením se získá ještě 5,0 g třetího podílu.

Všechny tři podíly silybinu (celkem 81,0 g) jsou chromatograficky shodné a použijí se k další rafinaci, popsané v příkladu 3.

P ř í k l a d 2

Násada 50 kg hrubě drcených plodů ostropestřece mariánského o velikosti částic 0,5 až 2,0 mm se extrahuje 250 l (5 dílů) 95% (obj.) vodného acetonu za míchání při teplotě 20 až 25 °C po dobu 5 h. Extrakt se oddělí a postup se opakuje ještě jednou stejným množstvím vodného acetonu. Při použití zařízení na protiproudou extrakci se droga při uvedené teplotě extrahuje takovou rychlostí, aby celkové množství 10 dílů rozpouštědla proteklo za dobu 10 h. Ve spojeném a zhomogenizovaném extraktu se stanoví obsah vody, který závisí na vlhkosti výchozí drogy, a koncentrace acetonu se upraví přidávkou vody na hodnotu 92 % (obj.). Po

rozmíchání se extrakt ponechá stát při teplotě 20 až 25 °C po dobu 20 h. Oddělí se 6 000 ml spodní olejové fáze, která poskytne po odpaření acetonu za sníženého tlaku 4 900 ml čistého oleje.

Po oddělení olejové vrstvy se extrakt zahustí za sníženého tlaku na objem 30 l, vzniklá suspenze se rozmíchá s 1 500 g chloridu sodného a po 30 minutách extrahuje 30 l petroletheru při teplotě 20 až 25 °C. Po odtažení uhlovodíkové vrstvy se odtučněná vodná suspenze odsaje a promyje 3x1 000 ml vody. Produkt se suší ve vakuové sušárně tak, aby obsahoval 15 % hmot. vody. Jeho hmotnost je 3 000 g. Pak se rozpustí v 10 l acetonu, zfiltruje a odpaří za sníženého tlaku k suchu.

Aceton a petrolether se regeneruje jako v příkladu 1.

Odparek z acetonu se rozpustí za varu v 10 l methanolu a ve třech podílech se získá krystalický silybin jako v příkladu 1. Hmotnosti jednotlivých podílů jsou 600 g, 150 g a 45 g. Celkový výtěžek 795 g představuje 1,59 % hmot. vztaženo na výchozí drogu. Další rafinace je uvedena v příkladu 3.

P ř í k l a d 3

Navážka 1 000 g krystalického silybinu, získaného z 95% methanolu podle příkladu 1 a 2, se rozpustí v 11 000 ml směsi aceton - kyselina octová o objemovém poměru 6,0:4,0 za varu pod zpětným chladičem. Přidá se 20,0 g aktivního uhlí a po 5minutovém varu se roztok za horka zfiltruje přes papírový filtr. Žlutý filtrát se zahustí za sníženého tlaku při vnější teplotě 60 °C na objem 4 000 ml. K tomuto roztoku se přilije při teplotě 60 °C 200 ml vody (5 % na koncentráту) a po promíchání počne spontánně krystalovat silybin. Směs se ponechá dále krystalovat při teplotě 20 až 25 °C po dobu 5 h, poté se krystaly odsají a promyjí postupně 500 ml 95% (obj.) vodné kyseliny octové, 500 ml methanolu a nakonec 1 000 ml 90% (obj.) vodného methanolu. Odsátý produkt se suší ve vakuové sušárně do konstantní hmotnosti.

Získá se 750 g krystalického silybinu, obsahujícího 0,5 % hmot. isosilybinu.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob výroby krystalického silybinu z přírodní neodtučněné drogy obsahující komplex flavanolignanů s obsahem alespoň 60 % hmot. silybinu včetně isosilybinu po extrakci drcené drogy 95% obj. vodným acetonem, vyznačující se tím, že se acetonový extrakt flavanolignanů zředí vodou na obsah 90 až 92% obj. acetonu, poté se oddělí spodní olejová vrstva a vodně acetonová fáze se zahustí, vzniklá suspenze surového silybinu se extrahuje alifatickým uhlovodíkem nebo směsí alifatických uhlovodíků s 5 až 8 atomy uhlíku, pak se vodná suspenze upraví přidávkou chloridu sodného, načež se po oddělení filtrátu získaný surový silybin předsuší odvětráním na obsah vody 10 až 20 % hmot. a rozpustí se v acetonu, poté se acetonová fáze přefiltruje a odpaří k suchu, odparek se za varu rozpustí v methanolu a po přidání 3 až 7 % obj. vody se ponechá krystalovat, načež se získaný silybin za varu rozpustí v soustavě kyselina octová:aceton ve vzájemném objemovém poměru 3,5 až 4,0:6,5 až 6,0 dílu, po přidání aktivního uhlí se roztok přefiltruje a čirý filtrát se po zahuštění na třetinu svého objemu zředí vodou v množství 5 % obj. vody na objem získaného koncentráту, načež se vyloučený čistý krystalický silybin oddělí.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se získaný surový silybin případně promyje chlorovaným uhlovodíkem typu dichlormethanu nebo chloroformu.