



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 649 543 A5

⑤① Int. Cl.⁴: C 07 D 307/91

// A 61 K 31/34

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer:	2174/82	㉗ Inhaber: Fabrika farmaceutskih i hemijskih proizvoda n.sol.o. OOUR "Zdravlje", Leskovac (YU)
㉓ Anmeldungsdatum:	07.04.1982	
㉔ Priorität(en):	08.04.1981 YU 919/81	㉘ Erfinder: Stankovic, Mihajlo, Leskovac (YU) Randjelovic, Milivoje, Dr., Leskovac (YU)
㉖ Patent erteilt:	31.05.1985	
㉙ Patentschrift veröffentlicht:	31.05.1985	㉚ Vertreter: Patentanwalts-Bureau Isler AG, Zürich

⑤④ **Verfahren zur Isolierung von (+)-Usninsäure aus Usnea barbata L.**

⑤⑦ Verfahren zur direkten und einfachen Gewinnung von (+)-Usninsäure, die wegen ihrer bioziden Wirkung in Pharmazie und Kosmetik verwendet wird, aus Usnea barbata L. mittels Extraktion mit Äthanol als Extraktionslösungsmittel und anschliessender Filtration unter Druck oder im Vakuum.

PATENTANSPRUCH

Verfahren zur Isolierung von (+)-Usninsäure aus *Usnea barbata* L., dadurch gekennzeichnet, dass *Usnea barbata* L. nach Entstauben mit Äthanol unter Rückfluss in einem Gewichtsverhältnis von 1:8 bis 1:12 extrahiert wird, der Extrakt durch Filtration unter Druck von $2 \cdot 10^5$ bis $3 \cdot 10^5$ Pa oder im Vakuum von $2,7 \cdot 10^3$ bis $13,3 \cdot 10^3$ Pa von der Droge abgetrennt und unter Rühren kristallisiert wird, die Kristalle durch Filtration entfernt, mit Äthanol gewaschen und getrocknet werden.

Das vorliegende Verfahren betrifft die Isolierung von (+)-Usninsäure aus *Usnea barbata* L. Usninsäure ist ein bekannter Stoff, der wegen seiner bioziden Wirkung in Pharmazie und Kosmetik verwendet wird. Die Isolierung von (+)-Usninsäure aus Moos und Flechte ist mit Problemen der Wahl der Rohstoffe, des optimalen Lösungsmittels und des optimalen Isolationsverfahrens verbunden. Es ist bekannt, dass man zur Gewinnung von (+)-Usninsäure verschiedene Moos- und Flechtenarten, wie *Evernia prunastri*, *Usnea barbata* L., *Ramalina reticulata* usw., anwenden kann. Die Wahl des Rohstoffs hängt vor allem von folgenden Forderungen ab:

- er muss in genügenden Mengen für industrielle Zwecke zugänglich sein,
- die darin enthaltene Menge von Usninsäure soll eine wirtschaftliche Herstellung gewährleisten (über 1%),
- die darin enthaltene Menge von extraktiven Begleitstoffen muss im Vergleich mit dem Gehalt an (+)-Usninsäure gering sein,
- die Löslichkeit der extraktiven Begleitstoffe im angewendeten Extraktionslösungsmittel soll beträchtlich kleiner als die der (+)-Usninsäure sein.

Usnea barbata L. entspricht fast vollständig diesen Forderungen und sie wird zur Gewinnung von (+)-Usninsäure gemäss dem erfindungsmässigen Verfahren verwendet. Die anderen Flechtenarten enthalten viel weniger (+)-Usninsäure oder werden vor allem als Rohstoffe zur Herstellung von Riechharzen (Resinoiden) verwendet. Das Lösungsmittel zur Isolation der (+)-Usninsäure soll

- (+)-Usninsäure möglichst selektiv in bezug auf extraktive Begleitstoffe extrahieren,
- eine maximale Ausbeute gewährleisten,
- ihre antibiotischen und fungiziden Eigenschaften nicht ändern,
- eine solche Qualität der isolierten Substanz, die allen Anforderungen deren Anwendung als Antibiotikum und Fungizid, vor allem in physiologischer Hinsicht, entspricht, gewährleisten,
- ihre einfachere und wirtschaftlichere Herstellung ermöglichen,
- nicht teuer und in genügenden Mengen zugänglich sein,
- nicht so toxisch und entzündbar sein, dass dadurch aufwendige Einrichtungen bedingt würden.

Beim Isolationsverfahren müssen folgende Bedingungen erfüllt werden:

- es soll einfach sein,
- dadurch sollen eine maximale Ausbeute und Qualität erzielt werden,
- teure und aufwendige Einrichtungen sollen vermieden werden,

- Arbeits- und Energieaufwand sowie Zeitverbrauch sollen minimal sein.

In der Literatur ist nur eine geringe Anzahl von Verfahren zur Isolation von (+)-Usninsäure aus verschiedenen Moos- und Flechtenarten beschrieben. Grösstenteils wird bei diesen Verfahren (+)-Usninsäure aus wachsigem Rückstand nach Abtrennung von Riechkomponenten gewonnen. Die verwendeten pflanzlichen Rohstoffe enthalten (+)-Usninsäure in viel kleineren Mengen als *Usnea barbata* L. Aus diesem Grunde und auch wegen viel grösserer Ausbeuten, wenn sie zur Gewinnung von Riechharzen verwendet werden, ist die Gewinnung von (+)-Usninsäure daraus von sekundärer Bedeutung. Hauptmerkmale dieser bekannten Verfahren sind:

- die Anwendung von zwei oder mehr Lösungsmitteln,
- die Anwendung von physiologisch toxischen Lösungsmitteln, wie Aceton, Benzol, Chloroform, 1, 1, 2-Trichloräthylen, Hexan usw. wodurch bedingt ist, dass Rückstände aus den Kristallen der (+)-Usninsäure vollständig entfernt werden müssen,
- kleinere Ausbeute von (+)-Usninsäure da zur Erzielung einer befriedigenden Qualität viele Reinigungsschritte nötig sind,
- erschwerte Regeneration von einzelnen Lösungsmitteln,
- aufwendige Herstellungsart (mehrere Reinigungsschritte, Regeneration mehrerer Lösungsmittel, Anwendung komplizierter Einrichtungen),
- Äthanol als eines der meist zugänglichen und vom technischen und physiologischen Standpunkt am besten geeigneten Extraktionslösungsmittel wird nicht verwendet,
- eine direkte Kristallisation von (+)-Usninsäure mit befriedigender Qualität aus einer Lösung der wachsigem Rückstände ist wegen beträchtlicher Löslichkeit der Begleitstoffe in angewendeten Lösungsmitteln nicht möglich,
- vom Standpunkt der Wirtschaftlichkeit sind die bekannten Verfahren für industrielle Gewinnung von (+)-Usninsäure sehr teuer.

Zur Herstellung von (+)-Usninsäure aus *Usnea barbata* L. sind nur wenige Verfahren beschrieben. Ihre Merkmale sind fast gleich wie bei Verfahren zur Gewinnung von (+)-Usninsäure aus wachsigem Rückständen der Resinoide. Es ist bekannt, dass reine (+)-Usninsäure in Äthanol löslich ist. Ihre Löslichkeit in Äthanol gegenüber den in bekannten Verfahren zur Extraktion empfohlenen Lösungsmitteln (Aceton, Chloroform, Äthylacetat, Benzol) ist jedoch viel schlechter. Aus diesem Grunde kam Äthanol bisher als mögliches Extraktionsmittel für (+)-Usninsäure nicht in Frage. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen gemäss vorliegender Erfindung haben jedoch überraschenderweise gezeigt, dass Äthanol ein optimales Lösungsmittel zur Gewinnung von (+)-Usninsäure ist, obwohl es bekannt ist, dass in Äthanol reine (+)-Usninsäure sehr schlecht löslich ist. In den bisher beschriebenen Verfahren wurde dieser Tatsache keine Aufmerksamkeit gewidmet und deshalb ist Äthanol nie als Extraktionslösungsmittel für (+)-Usninsäure verwendet worden. Die Löslichkeit einer gegebenen Substanz in einem gegebenen Lösungsmittel wird nämlich wegen Anwesenheit von anderen extraktiven Stoffen aus dem pflanzlichen Rohstoff im Extrakt erhöht oder verringert. Die Vorteile Äthanol gegenüber den bisher verwendeten Lösungsmitteln sind wie folgt:

- erhöhte Löslichkeit von (+)-Usninsäure im äthanolischen Extrakt der *Usnea barbata* L. in Anwesenheit von extraktiven Begleitstoffen aus dem pflanzlichen Rohstoff,

- die Menge der extrahierten extraktiven Begleitstoffe in Äthanol ist klein, so dass (+)-Usninsäure direkt aus dem äthanolischen Extrakt in reinem Zustand und mit befriedigender Ausbeute (etwa 85% bis 90% in bezug auf den Gehalt im pflanzlichen Rohstoff) kristallisieren kann,
- die Löslichkeit von (+)-Usninsäure bei Siedetemperatur des Äthanolis ist viel grösser als die der extraktiven Begleitstoffe,
- die Löslichkeit von (+)-Usninsäure ist bei Kristallisationstemperatur (unter +15°C) sehr klein, die der Begleitstoffe jedoch noch immer gross, so dass sie mit geringen Beimengungen kristallisiert,
- die Löslichkeit von (+)-Usninsäure in den bisher verwendeten Extraktionslösungsmitteln ist viel grösser, doch sind auch die Begleitstoffe darin viel besser löslich, so dass eine direkte Kristallisation aus dem Extrakt wie im Falle des Äthanolis nicht möglich ist.

Als der Stand der Technik sollen folgende Verfahren angegeben werden:

a) Vest. Akad. Nauk UdSSR, 26, Nr. 7, 35-7 (1956)

(+)-Usninsäure wird durch Extraktion aus der Flechte mit heissem Benzol isoliert, dann wird Benzol eingedampft, der Rückstand mit einer sehr kleinen Menge des heissen Chloroforms behandelt, Chloroform wird eingedampft und der Eindampfrückstand wird mit einer dreimaligen Gewichtsmenge von kaltem Äthanol in bezug auf Trockensubstanzgewicht behandelt. So erhaltene (+)-Usninsäure wird weiter durch sukzessive Lösung in heissem Chloroform, kaltem Äthanol in Äther gereinigt.

b) FR-PS 7 611 964 (Isolation von (+)-Usninsäure aus wachsartigem Rückstand des abs. Flechtenextraktes)

Der wachsartige Rückstand wird mit Lösungsmitteln, wie Benzol, Hexan, Aceton, Chloroform und 1, 1, 2-Trichloräthylen extrahiert. Die erhaltene Lösung wird bis zum Sieden erhitzt, filtriert und gekühlt, worauf (+)-Usninsäure auskristallisiert. Die Ausbeute von (+)-Usninsäure beträgt 20 bis 25% mit Benzol bzw. 35 bis 40% mit Hexan.

c) RO-PS 58.246

(+)-Usninsäure wird aus *Usnea barbata* L. mit Benzol unter Rückfluss dreimal extrahiert, die vereinigten Extrakte werden auf ein kleines Volumen eingengt und aus der konzentrierten Lösung wird (+)-Usninsäure mit Aceton ausgefällt.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist im Patentanspruch definiert. Gemäss dem Verfahren wird die Droge nach dem Entstauben mit Äthanol unter Rückfluss extrahiert. Der erhaltene Extrakt wird filtriert und in einen Kristallisationsbehälter überführt. Die Kristallisation erfolgt unter Aussenkühlung des Behälters und unter Rühren der Lösung. Feine gelbe Kristalle der (+)-Usninsäure werden durch Filtration unter Druck ($2 \cdot 10^5$ Pa bis $3 \cdot 10^5$ Pa) oder im Vakuum ($2,7 \cdot 10^3$ Pa bis $13,3 \cdot 10^3$ Pa) abgetrennt, mit kaltem Äthanol gewaschen und getrocknet. Aus dem Filtrat wird Äthanol mittels Säulendestillation regeneriert. Das vorliegende Verfahren

unterscheidet sich wesentlich von bekannten Verfahren und weist die folgenden wesentlichen Vorteile auf:

- Extraktionsverfahren ist schnell und einfach,
- 5 - die Anwendung von nur einem Lösungsmittel,
- Äthanol wird zum ersten Mal als das optimale Lösungsmittel für Extraktion von (+)-Usninsäure aus *Usnea barbata* L. verwendet, obwohl es bekannt ist, dass reine Usninsäure darin sehr schlecht löslich ist,
- 10 - vom technischen und physiologischen Standpunkt ist Äthanol den bisher verwendeten Lösungsmitteln überlegen (es ist leicht zugänglich, etwaige Rückstände in Kristallen brauchen nicht entfernt zu werden, es ist weniger gefährlich bei industrieller Anwendung, es ist weniger toxisch),
- 15 - direkte Kristallisation von (+)-Usninsäure aus äthanolischem Extrakt ohne vorherige Konzentrierung,
- hohe Ausbeuten an (+)-Usninsäure (über 90% in bezug auf den Gehalt im Rohstoff),
- wegen der guten Qualität der (+)-Usninsäure, die durch direkte Kristallisation aus äthanolischem Extrakt erhalten wird, erübrigen sich nachträgliche Reinigungsschritte, die bei bekannten Verfahren nötig sind,
- die Möglichkeit der Regeneration des Lösungsmittels über 90%,
- 25 - eine einfache Produktionsanlage,
- beträchtlich grössere Wirtschaftlichkeit des vorliegenden Verfahrens im Vergleich mit bekannten Verfahren.

Folgende Beispiele dienen zur näheren Erläuterung der vorliegenden Erfindung, ohne sie einzuschränken.

Beispiel 1

100 kg *Usnea barbata* L. werden nach dem Entstauben mit 800 kg Äthanol (96%ig, pharm. Qualität) unter Rückfluss 30 Minuten extrahiert. Nach der Filtrierung über ein Stahlnetz wird der Extrakt in einen Kristallisationsbehälter mit wässriger Aussenkühlung eingeführt, worin innerhalb von 8 Stunden unter Rühren (+)-Usninsäure auskristallisiert. Kristalle der (+)-Usninsäure werden durch Filtration unter Druck ($2 \cdot 10^5$ bis $3 \cdot 10^5$ Pa) oder im Vakuum ($2,7 \cdot 10^3$ bis $13,3 \cdot 10^3$ Pa) abgetrennt, mit Äthanol gewaschen und getrocknet. Aus dem Filtrat werden durch Abdampfen 90 bis 95% des Äthanolis regeneriert. Die Ausbeute der (+)-Usninsäure im Kristallisat beträgt 90% in bezug auf den Gehalt im pflanzlichen Rohstoff. Der Gehalt von (+)-Usninsäure/Smp. 204°C, $[\alpha]_{25}^D + 498$ (in Chloroform)/ ist 98% in bezug auf Trockensubstanz.

Beispiel 2

100 kg *Usnea barbata* L. werden wie im Beispiel 1 behandelt mit dem Unterschied, dass die Extraktionszeit 60 Minuten, die Menge des Äthanolis für Extraktion 1200 kg und die Kristallisationszeit 12 Stunden betragen. Die Ausbeute an (+)-Usninsäure im Kristallisat beträgt 90% in bezug auf den Gehalt im pflanzlichen Rohstoff. Der Gehalt der (+)-Usninsäure/Smp. 204°C, $[\alpha]_{25}^D + 498$ (in Chloroform)/ im Kristallisat beträgt 96% in bezug auf Trockensubstanz.