

NORGE



STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN

Utlegningskrift nr. 128515

Int. Cl. A 23 j 7/00 Kl. 53i-3/01
C 07 f 9/10

Patentsøknad nr. 4794/68 Inngitt 29.11.1968

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 3.6.1969

Søknaden utlagt og utlegningskrift utgitt 3.12.1973

Prioritet begjært fra: 1.12.1967 Storbritannia,
nr. 54905/67

UNILEVER N.V.,
Museumpark 1, Rotterdam, Nederland.

Oppfinner: Rajindra Aneja, 2 Sheepcote,
Welwyn Garden City,
Hertfordshire, England.

Fullmektig: Siv.ing. Sigrun E. Græsbøll.

Fremgangsmåte for å skille fosfatider.

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for adskillelse av fosfatider fra blandinger som inneholder dem.

Fosfatidblandinger oppnåes som biprodukter ved fremstillingen av vegetabiliske oljer og brukes i margarinindustrien på grunn av deres emulgerende egenskaper i vann-i-oljeemulsjoner. Slike fosfatidblandinger består av forskjellige fosfatider, spesielt etanolamin-, serin-, inositol- og kolin-fosfatider, sammen med nøytral triglyceridolje, frie fettsyrer, vann og andre ledsagende substanser inklusive små mengder steroider. Mengdene av triglyceridolje som er til stede i fosfatider av handelsvare, er ofte i området 30 til 40 vektprosent av det totale materiale, og produktene er viskøse væsker. Handelsblandinger av disse fosfatider betegnes ofte som lecitin, men dette navn brukes også mer spesifikt

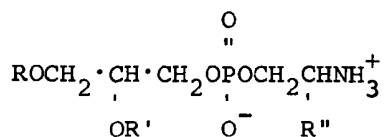
Kfr. kl. 53i-3/02

128515

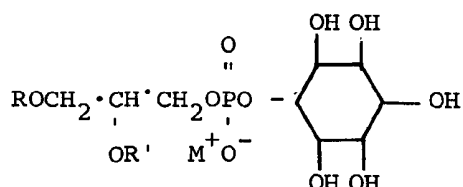
2

for kolinfosfatidet selv, og det er denne betydning lecitin har i denne beskrivelse.

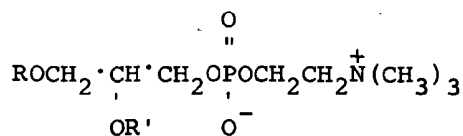
Etanolamin og serinfosfatider har strukturen:



hvor R og R' er langkjedede fettsyreradikaler og R'' er henholdsvis hydrogen og hydroksykarbonyl. Disse fosfatider er sammen kjent under navnet kefalin. Inositolfosfatider har strukturen:



hvor R og R' er langkjedede fettsyreradikaler og M er et metallatom, f.eks. natrium, kalium, kalsium eller magnesium, og inositolgruppen kan være substituert med glycosid eller andre radikaler. En meget aktiv emulgator komponent i fosfatidblandingen er kolinfosfatidet, lecitin, som har strukturen:



hvor R og R' er langkjedede fettsyreradikaler. Alle fire fosfatider har en syrehydroksylgruppe, ovenfor vist i saltform, men av de tre nitrogenholdige fosfatider er det bare lecitin som ikke har noen fri aminogruppe.

Der hvor kefalin og lecitin er tilstede sammen i en fosfatidblanding, som i de biprodukter som er omtalt ovenfor, har kefalin en skadelig effekt på lecitinets emulgeringsevne ved en slags antagonisering, f.eks. når det brukes i margarin. Andre uønskede egenskaper er også blitt forbundet med kefalin. Således har parenteralt inngitte fettemulsjoner som er fremstilt ved bruk av fosfatider som inneholder kefalin, en hypertensiv virkning som det tilstedeværende kefalin er ansvarlig for, og hvis fosfatidblandinger hydrogeneres, så antas tilstedeværende kefalin vanligvis å ha en deaktivierende effekt på katalysatoren. På den annen side hefter det ingen ulemper ved nærværet av inositolfosfater.

Det er følgelig blitt lett etter metoder som unngår kefalinets skadelige effekt. I én slik prosess, beskrevet i fransk patentskrift 1 507 922, modifiseres vegetabiliske fosfatidblandinger ved omsetning av den frie aminogruppe i det tilstedeværende kefalin med et acyleringsmiddel. Dette gir acylkefalin som ikke antagoniserer lecitinets emulgeringsevne, slik at fosfatidblandingen, hvor acylkefalinet forblir, har forbedret emulgeringsvirkning.

Det har vært gjort forsøk på å skille kefalin fra lecitin i fosfatidblandinger i den hensikt å oppnå et fosfatid med høyere lecitinkonsentrasjon, med forbedrede egenskaper, men dette har vist seg å være et vanskelig problem. Løsningsmiddel-fraksjonering resulterer i en delvis adskillelse og gir lecitin- og kefalin-anrikede fraksjoner. Britisk patent 1 113 241 beskriver en anrikningsprosess av denne type, hvor det brukes en vandig alkoholekstrahering, hvor forholdet mellom lecitin og kefalin økes fra 1 : 1 til 5 : 1 i ekstrakten, men vesentlige mengder lecitin forblir i ekstraksjonsresten.

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for behandling av fosfatidblandinger slik at man får frittflytende, faste

128515

fosfatider som er praktisk talt fri for kefalin.

Det er oppdaget at hvis fosfatidblandinger som inneholder kefalin og lecitin, acyleres for omdannelse av det tilstedeværende kefalin til acylkefalin, så kan lecitet og acylkefalin lett skilles ved løsningsmiddelfraksjonering med aceton eller metylacetat når det er tilstrekkelig av en acetonløselig eller metylacetatløselig nitrogenbase til stede til å gi basiske betingelser som tilsvarende en pH-verdi i vann på minst 8,5. Acylkefalin ekstraheres av løsningsmidlet, og lecitin blir tilbake. Dessuten er separasjonen effektiv til og med i nærvær av store mengder triglyceridolje slik de er tilstede i handelsfosfatider. Triglycerider fjernes med kefalin.

US-patent 3 301 881 beskriver en fremgangsmåte for fremstilling av acylerte fosfatider, hvor acyleringsproduktene nøytraliseres med baser som omfatter ammoniakk og organiske aminer, f.eks. trietanolamin. I den hensikt å sammenligne produktene med ikke-acylerte kontrollprøver ekstraheres de med aceton for bestemmelse av prosent aceton-uløselig materiale. Ved den pH-verdi som resulterer fra nøytraliseringen, som alltid er under 8,5, er mengden av aceton-uløselig materiale i produktet ikke vesentlig forandret, slik at en utskillelse av fosfatider i likhet med den som møtes i foreliggende oppfinnelse, ikke finner sted.

Oppfinnelsen tilveiebringer altså en fremgangsmåte for å skille et N-acylfosfatid fra et fosfatid uten en acylerbar aminogruppe, hvor en blanding som omfatter disse, gjøres basisk med en nitrogenbase til en pH-verdi på minst 8,5 i vandig miljø og løsningsmiddelfraksjonert med aceton eller metylacetat.

I praksis omsettes en fosfatidblanding som omfatter N-acylerbare og ikke-N-acylerbare fosfatider, med et acyleringsreagens for omdannelse av det N-acylerbare fosfatid til N-acylfosfatid, og det acylerte produkt gjøres basisk med en nitrogenbase til en pH-verdi på minst 8,5 i vandig miljø og løsningsmiddelfraksjoneres med aceton eller metylacetat.

I praksis er det N-acylerbare fosfatid kefalin, og i det minste noe lecitin er fortrinnsvis tilstede som ikke-acylerbart fosfatid, slik at fosfatidblandingen omfatter kefalin og lecitin.

Som fosfatid-utgangsmaterialer for separasjonsprosessen kan brukes handelsfosfatider, f.eks. de hydratiserte vegetabiliske fosfatider som oppnås ved behandling med en liten mengde vann av en fosfatidholdig råolje som er ekstrahert fra planter, f.eks. rå sojaolje, slik at fosfatidene blir hydratisert og felles som en gummi og deretter skilles. Eggeplommefosfatider kan også brukes. Fortrinnsvis inneholder fosfatidblandingen fra 0,1 til 20 deler lecitin for hver vektandel kefalin. Slike fosfatider og modifikasjoner av dem som kan brukes, er beskrevet i britisk patentskrift 1 118 373. Lecitinanrikede eller kefalinanrikede fosfatider oppnådd ved løsningsmiddelfraksjonering med vandige alkoholer som beskrevet i britisk patentskrift 1 113 241, kan brukes. Vegetabiliske fosfatidprodukter som inneholder opptil 80 %, f.eks. fra 20 til 60 %, triglyceridolje kan brukes. De acylerte fosfatidblandinger som er oppnådd som beskrevet i fransk patentskrift 1 507 922, kan også anvendes. Delvis hydrogenerte fosfatidblandinger kan brukes når de opprinnelige fettsyre-acylgrupper inneholdt slike grupper av umettede fettsyrer og noen av disse er blitt mettet ved hydrogenering. Fosfatid-utgangsmaterialene kan inneholde betydelige mengder vann selv før acyleringstrinnet, da det er funnet at nærvær av vann ikke har alvorlig innvirkning på N-acyleringen og hjelper til med å forhindre O-acylering ved overskudd av acyleringsreagens som kunne gi fosfatider hvor hydroksylgruppene til de tilstedeværende inositolfosfatider, såvel som hydroksylgruppen som er festet til fosforatomet, acyleres. Acylering ved fosforatomet forårsaker ikke noe problem, da acylgruppen kan fjernes ved etterbehandling med vann, men acyleringen av inositolgrupper kan representere et unødvendig tap av acyleringsreagens, da inositolfosfatider kan være til stede i store mengder. Dessuten kan de angjeldende inositol-hydroksylgrupper såfremt de er acylert, ikke dannes igjen, da de betingelser som er nødvendige for dette, ville fjerne acylgruppene som forestrer glycidylradikalet og således ødelegger fosfatidene.

Som acyleringsreagens brukes fortrinnsvis et karboksylsyreanhydrid, spesielt et fettsyreanhydrid, f.eks. eddiksyre-, propionsyre-, kaprinsyre-, oleinsyre- eller stearinsyreanhydrid, eller blandede anhydrider som f.eks. de som oppnås av sojabønnefettsyrer ved trans-anhydrisering med eddiksyreanhydrid. Anhydrider av maleinsyre, ravsyre, eller ftalsyre kan også brukes. Andre acyleringsreagenser, f.eks. acylklorider, f.eks. acetylklorid, og keten, kan brukes, men da de reagerer lettere med vann og med

hydroksylgrupper til substanser som er til stede i utgangsmateria-
lene, er de mindre effektive enn anhydrider. Den nødvendige meng-
de acyleringsreagens er den som er nødvendig for å acylere alle de
frie aminogrupper som er til stede, når man regner med tap av rea-
gens i tilfelle vann som er til stede, influerer ved hydrolyse.
Da fosfatider sjelden inneholder mer enn 30 % kefalin, er 4 % eddik-
syreanhydrid, regnet på vekten av fosfatider, vanligvis tilfreds-
stillende. I tilfelle av at fosfatid-utgangsmaterialet er høyvis-
køst, kan reaksjonen utføres i et egnet inert løsningsmiddelmiljø,
f.eks. i heksan, benzen eller kloroform, eller til og med i aceton
eller metylacetat hvis vesentlige mengder triglycerider er til ste-
de, men det er ikke nødvendig med noe løsningsmiddel hvis fosfatid-
blandingen inneholder tilstrekkelige triglyceridoljer til å gjøre
den flytende. Blandingen må røres under reaksjonen, og dette er
spesielt ønskelig når det ikke anvendes løsningsmiddel. Acylerin-
gen kan føres i inert atmosfære, f.eks. under nitrogen.

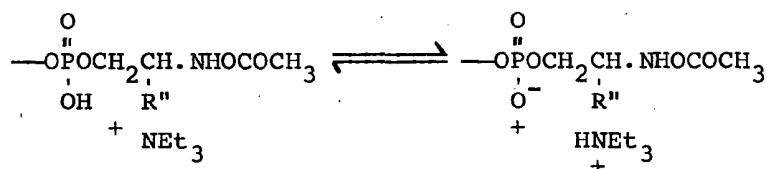
Acyleringen utføres fortrinnsvis i nærvær av et ikke-
acylerbart amin som katalysator. Egnede katalysatorer er tertiære
aminer, f.eks. pyridin og tertiære alkylaminer, spesielt trime-
tylamin og trietylamin.

Hvis det ikke brukes noen katalysator, kan acyleringen
ikke løpe helt ut selv med et betydelig overskudd av acyleringsre-
agens, og reaksjonstiden og -temperaturen som er nødvendig, blir
henholdsvis lengre og høyere, f.eks. fra 1 til 2 timer ved fra 55°
til 70°C, eller 24 timer ved 30°C. Reaksjon ved 90°C krever bare
noen minutter, men temperaturer over 80°C unngås fortrinnsvis.
Når det brukes katalysator, er det bare nødvendig med et lite over-
skudd, da reaksjonen er hurtig og når det gjelder lavere fettsyre-
anhydrider, f.eks. eddiksyreranhydrid, løper den helt ut selv ved
romtemperatur i løpet av noen få minutter. Hvis en katalysator an-
vendes, utføres derfor reaksjonen fortrinnsvis ved romtemperatur.

Forløpet av acyleringsreaksjonen kan følges med tynnsjikt-
kromatografi på silikagelplater med en blanding av kloroform, meta-
nol og vann i volumforholdet 65 : 25 : 4 som mobil fase, og med be-
handling av det utviklede kromatogram med ninhydrinreagens. Reak-
sjonen er fullstendig når den rosa flekken av R_f ca. 0,6, på grunn
av fri primær aminoforbindelse, ikke lenger er synlig. Det kan ut-
føres foreløpige tester ved å bruke denne teknikk for bestemmelse
av mengde acyleringsreagens og andre betingelser som er riktiggst
for bruk ved acylering av en hvilken som helst spesiell fosfatid-
blanding, f.eks. en blanding med ukjent N-acylerbart fosfatidinn-
hold.

Etter acyleringen kan biproduktet fri fettsyre og overskytende acyleringsreagens nøytraliseres eller fordampes hvis syren og acyleringsreagenset er flyktig, f.eks. under redusert trykk. Et hvert løsningsmiddel som ville interferere med den etterfølgende fraksjonering, kan også fjernes ved fordampning. Løsningsmidlet, syren, det overskytende acyleringsreagens og triglyceridoljen kan også fjernes ved ekstraksjon av produktet med aceton før det gjøres alkalisk.

I løsningsmiddelfraksjoneringstrinnet, som normalt vil bestå av ekstrahering med løsningsmidlet og separering av fasene som inneholder N-acylfosfatidet uten en acylerbar aminogruppe, brukes aceton eller metylacetat (eller en blanding av disse) i forbindelse med en nitrogenbase med adekvat alkalitet. Nitrogenbasen kan tilsettes til acyleringsproduktet, men i tilfelle av at en tilstrekkelig mengde acyleringskatalysator med adekvat alkalitet blir tilbake for å gi egnede alkaliske betingelser, er det unødvendig å tilsette ytterligere nitrogenbase før fraksjonering. Alternativt kan nitrogenbasen inkorporeres i fraksjoneringsløsningsmidlet. Dessuten kan acylering og løsningsmiddelekstraksjon utføres samtidig, så som hvis et fast fosfatid som er fritt for triglyceridolje, er suspendert i aceton som inneholder acyleringsreagens, og et ikke-acylerbart amin som tjener både som katalysator og base. I tilfelle av at acyleringen utføres uten katalysator, tilsettes fortrinnsvis nitrogenbasen til acyleringsblandingen før ureagert acyleringsreagens skilles fra denne, da dette sikrer at acyleringen er fullstendig. Nitrogenbasens funksjon ved fraksjoneringen påstås å være at den omdanner acylfosfatidet til dets konjugerte anion, f.eks.:



slik at hvis eventuelt aceton eller metylacetat tilsettes, de negative ioner støter hverandre tilbake, er ute av stand til å danne aggregater og oppløses i løsningsmidlet.

Egnede nitrogenbaser er aminer med høy pKa, fortrinnsvis minst 9, spesielt primære, sekundære og tertiære alifatiske aminer, f.eks. alkylaminer, og inkluderer følgende forbindelser med pKa som angitt: dietylamin 10,9, dimetylamin 10,8, trietylamin 10,7, metylamin 10,6, etylamin 10,6, trimetylamin 9,8. Eta-

nolamin 9,5 og ammoniakk 9,2 kan også brukes, selv om de er mindre effektive på grunn av at de fremkaller aggregatdannelse ved hydrogenbinding. Kvaternære ammoniumhydroksyder, f.eks. tetraetylammoniumhydroksyd, som reagerer med acylkefalin og gir dets konjugerte anion og vann, kan også brukes. En mengde av nitrogenbase som er tilstrekkelig til å gi basiske betingelser som tilsvarende en pH-verdi i vann på minst 8,5, og fortrinnsvis minst 9, anvendes. Den nødvendige mengde bestemmes ganske enkelt ved å undersøke mengden av nitrogenbase som trengs for å gi den nødvendige pH-verdi når en prøve av det acylerte fosfatidprodukt dispergeres i vann i 1 % konsentrasjon. Den nødvendige mengde er mer enn det minimum som er nødvendig for bruk som katalysator i acyleringstrinnet.

Fraksjoneringstrinnet kan utføres ved benyttelse av standardprosessen som går ut på acetonekstraksjon for bestemmelse av acetonuløselig materiale i fosfatider, beskrevet i American Oil Chemists' Society Official Method Ja 4-46. Acetonekstraksjonen fjerner acylkefalin og eventuelt tilstedeværende triglyceridolje, og den lecitinrike fraksjon utgjør ekstraksjonsresten. Materialet som skal fraksjoneres, kan være ekstrahert flere ganger med aceton som inneholder nitrogenbase, og endelig med aceton alene. Metylacetat kan brukes på samme måte. Ekstraksjonen utføres fortrinnsvis ved romtemperatur.

Selv om en total adskillelse av acylkefalin og lecitin ikke kan fullføres i ethvert spesielt tilfelle, så oppnår man en meget mer fullstendig fraksjonering enn når det gjøres forsøk på å skille komponentene med aceton uten tilstedeværende nitrogenbase. Ekstraksjonsrestene inneholder meget lite acylkefalin og oppnåes som stråfarvede væsker som når de males danner frittflytende pulvere som er lett dispergerbare i vann eller triglyceridoljer. De er spesielt verdifulle som emulgatorer og dispergeringsmidler. Det fremstilte acylkefalin kan gjenvinnes fra acetonekstraktene etter fjerning av nitrogenbase og aceton ved egnede metoder, f.eks. inndampning. Acylkefalinene kan også brukes som emulgatorer. Et acylkefalin kan gjendannes til kefalin i tilfelle av at acylgruppen er av en slik natur at den kan fjernes uten ødeleggelse av kefalin. Hvis derfor acyleringen utføres med ftalsyreanhydrid, kan det resulterende o-karboksybenzoylkefalin cycliseres ved oppvarmning eller innvirkning av eddiksyreanhydrid, slik at man får ftaloylkefalin og kefalin frigitt fra dette ved oppvarmning med hydrazin.

De produkter av fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen

som inneholder både lecitin og inositolfosfatider, kan fraksjoneres videre med alkohol og gi alkoholløselige fraksjoner som er anriket på lecitin og alkoholuløselige fraksjoner som er anriket på inositolfosfatider.

Oppfinnelsen skal i det følgende belyses ved hjelp av eksempler, hvor alle temperaturer angir $^{\circ}\text{C}$, og hvor det acetonuløselige materiale ble bestemt ved hjelp av den A.O.C.S.-metode som det er henvist til ovenfor. TLC er tynnsjikt-kromatografi.

Eksempel 1

En handelsvare av ubleket kanadisk sojafosfatid av middels kvalitet med følgende tilnærmede sammensetning ble brukt som startmateriale.

	<u>Vektdeler</u>
Triglycerider	40
Totalt aceton-uløselig materiale	60
Lecitin	15
Kefalin	12
Inositolfosfatider	23
Sukkerarter, steroider og salter	10
Vann	41
Totalt fosforinnhold	2,2

Dette fosfatid (100 g) og eddiksyreanhydrid (4 g) ble rørt sammen kraftig under nitrogen ved 74° (badtemperatur) i 2 timer og deretter avkjølt hurtig til 20° . Den acylerte blanding ble rørt med kokende aceton (200 ml, med tilsetning av 4 ml vann), avkjølt til 0° i et isvannbad og acetonløsningen som inneholdt triglyceridolje, eddiksyre og -anhydrid dekantert av. Den uløselige rest fra denne første ekstraksjon ble rørt med en kokende blanding av aceton (200 ml, + 4 ml vann) og trietylamin (6 ml, tilsvarende en pH-verdi over 9 i en 1% vandig dispersjon), avkjølt til 0° og løsningsmidlet dekantert av. Denne ekstraksjon ble gjentatt ved bruk av aceton (200 ml, + 4 ml vann) og trietylamin (2 ml). Produktet ble pulverisert med kokende aceton (200 ml) og det varme aceton dekantert av. Denne fjerde acetonekstraksjon ble gjentatt og produktet til slutt pulverisert med aceton (200 ml) ved 20°C , filtrert og tørket under redusert trykk ved 20°C . Dette ga et utbytte av et sprødt, stråfarvet fast stoff (42,1 g) som inneholdt 3,2 % fosfor, 32 % lecitin, 1 % triglyceridolje og praktisk talt intet kefalin, men ca. 1-2 % acetylkefalin ifølge TLC-analyse.

Eksempel 2

Eksempel 1 ble gjentatt med bruk av kaprinsyreanhydrid (10,0 g) i stedet for eddiksyreanhydrid som acyleringsreagens. Badtemperaturen lå i området 70° til 82°C. Halvparten (55 g) av det acylerte materiale ble forarbeidet videre og ga som utbytte et fast produkt (22 g).

Eksempel 3

Handelsfosfatidet fra eksempel 1 (100 g) ble oppvarmet ved 75° i 2 timer under nitrogen med et blandet anhydrid (20 g) fremstilt av sojaoljefettsyrer ved trans-anhydridisering med eddiksyreanhydrid. En del (10 g) av acyleringsblandingen ble utsatt for fem ekstraksjoner med aceton (40 ml, + 0,8 ml vann) slik som i eksempel 1, idet acetonet inneholdt trietylamin i annen og tredje ekstraksjon (henholdsvis 0,6 g og 0,2 g amin, som var tilstrekkelig til å gi en alkalitet ekvivalent med en pH-verdi over 9 i 1 % vandig dispersjon). Sluttproduktet ble oppnådd i form av en fast rest (3,6 g).

Da en lignende serie ekstraksjoner ble utført på en annen del (10 g) av acyleringsblandingen, men uten tilsetning av amin, var utbyttet av uløselig rest 4,6 g, og produktet inneholdt en vesentlig mengde acylkefalin.

Eksempel 4

En handelsvare av alkoholløselig fosfatidprodukt som inneholdt 30 % acetonuløselig og som var anriket på lecitin, ble delvis avfettet ved acetonekstraksjon, og man fikk en acetonuløselig rest med følgende tilnærmede sammensetning.

	<u>Vektdeler</u>
Triglycerider	15
Totalt aceton-uløselig materiale	85
Lecitin	55
Kefalin	10
Inositolfosfatider	5
Sukkerarter, steroider og salter	15
Vann	1

Dette fosfatid (8,5 g) ble oppløst i kloroform (50 ml), eddiksyreanhydrid (2 ml) tilsatt og blandingen oppvarmet under tilbakeskjøling i 1 time. Løsningsmidlet, eddiksyren og det overskytende anhydrid ble fjernet ved inndampning i en roterende inndamper under redusert trykk. Til inndampningsresten ble det tilsatt

aceton (100 ml med 2 % vann) hvor det var inkorporert trietylamin (0,2 ml, som var tilstrekkelig til å gi en alkalitet som tilsvarte en pH-verdi over 9 i 1 % vandig dispersjon) og blandingen ble oppvarmet til kokning, avkjølt til romtemperatur og deretter avkjølt i isvann. Acetonet ble dekantert av og spor av aceton fjernes fra resten ved romtemperatur under redusert trykk. Man fikk et produkt (5,2 g) som ved TLC-analyse viste at det hadde lecitin som dominerende bestanddel og bare små spor av kefalin og acylkefalin.

Sammenligningsforsøk viste at hvis henholdsvis acyleringen og aminet ble utelatt, så ble det oppnådd utbytter på 7,5 g og 6,4 g uløselig produkt, som inneholdt vesentlige mengder kefalin eller acylkefalin, respektive.

Eksempel 5

En handelsvare av alkoholuløselig, avfettet fosfatidfraksjon som var anriket på kefalin, og med følgende tilnærmede sammensetning ble brukt som startmateriale.

	<u>Vektdeler</u>
Triglycerider	4
Totalt aceton-uløselig materiale	96
Lecitin	4
Kefalin	28,5
Inositolfosfatider	55
Sukkerarter, steroider og salter	8,5

Dette fosfatid (25 g) ble oppløst i n-heksan (100 ml) og eddiksyreanhydrid (1,5 g) tilsatt. Blanding ble oppvarmet under tilbakeløpskjøling i nitrogenatmosfære i 1 time, avkjølt til 30° og trietylamin (5 ml) tilsatt. Etter grundig blanding ble den resulterende løsning (som inneholdt tilstrekkelig base til å gi en pH-verdi over 9 i 1 % vandig dispersjon) innført langsomt i løpet av 15 minutter i kraftig omrørt aceton (250 ml). Etter at alt var tilsatt, ble utfelningsproduktet filtrert av, rørt med aceton (250 ml) og suspensjonen igjen filtrert. Resten ble tørket under redusert trykk og ga et produkt (18,4 g) hvis TCL-analyse viste at det var praktisk talt fri for kefalin og acetylkefalin.

I et sammenligningsforsøk som var likt i alle henseende med unntagelse av at eddiksyreanhydrid ble utelatt, var utbyttet av rest 23,2 g og inneholdt mesteparten av det opprinnelige kefalin.

128515

12

Eksempel 6

Eksempel 1 ble gjentatt ved bruk av, i stedet for handelsproduktet det kanadiske sojafosfatid, en handelsvare av alkoholuløselig fraksjon fremstilt av sojafosfatid ved ekstrahering av 1 vektdel fosfatid med 3,5 deler vandig 90 % etanol ved romtemperatur i noen få minutter, avdekantering av etanolen og opptak av resten som hadde følgende tilnærmede sammensetning.

	<u>Vektdeler</u>
Triglycerider	41
Totalt aceton-uløselig materiale	59
Lecitin	12
Kefalin	12
Inositolfosfatider	29
Sukkerarter, steroider og salter	6
Vann	<1

Fra fosfatidutgangsmaterialet (100 g) ble det oppnådd et fast produkt (34 g) som inneholdt bare spor av kefalin og acylkefalin.

Eksempel 7

Den alkoholuløselige fosfatidfraksjon fra eksempel 6 (100 g) ble acetyleret med eddiksyreanhydrid (4 g) som i eksempel 1, og til den acylerte blanding ved 20-22° ble det tilsatt aceton (25 ml) og trietylamin (10 ml, tilstrekkelig til å gi en alkalitet tilsvarende pH over 9 i 1 % vandig dispersjon), og blandingen ble rørt i 10 minutter og deretter tømt langsomt inn i kraftig omrørt aceton (1000 ml + 20 ml vann). Utfellingsproduktet ble filtrert av, suspendert i aceton (1000 ml) og suspensjonen oppvarmet til kokning og deretter avkjølt under omrøring i 30 minutter, til 15-18°.

Produktet (44,8 g) ble isolert ved filtrering, vaskning med aceton (500 ml) og tørkning under redusert trykk.

Eksempel 8

Den alkoholuløselige fosfatidfraksjon fra eksempel 9 (100 g) ble acetyleret med eddiksyreanhydrid (4 g) som i eksempel 1, dietylamin (5,3 g) ble dispergert inn i den acylerte blanding (dette ga en alkalitet som tilsvarte pH over 9 i 1% vandig dispersjon), og det ble deretter langsomt helt ned i kraftig omrørt aceton (1000 ml + 20 ml vann) ved 54°. Røringen ble fortsatt i 30

minutter under avkjøling til romtemperatur, det suspenderte materiale skilt ved filtrering, resuspendert og rørt i aceton (1000 ml), og det ble til slutt filtrert, vasket med aceton (500 ml) og tørket under redusert trykk, og man fikk produktet (42,8 g).

Eksempel 9

Eksempel 8 ble gjentatt i alle henseender med unntagelse av at aceton av romtemperatur ble brukt hele tiden. Utbyttet av produktet var 44,0 g.

Eksempel 10

Arbeidsmåten fra eksempel 9 ble gjentatt med unntagelse av at det ble anvendt trimetylamin (4,4 g) i stedet for dietylamin. Da dette amin er svært flyktig (kp. $3,5^{\circ}$), ble det tilsatt til den acylerte blanding avkjølt til -5°C som 20 % løsning i kald aceton og blandingen deretter latt oppvarme seg til romtemperatur. Utbyttet av produktet var 49,1 g.

Eksempel 11

Eksempel 7 ble gjentatt, med unntagelse av at i stedet for trietylamin ble det anvendt konsentrert ammoniakk som nitrogenbase (15 ml, sp. v. 0,88, tilstrekkelig til å gi en alkalitet som tilsvarte pH over 9 i 1 % vandig dispersjon). Det ble oppnådd et utbytte på 47,4 g av produktet.

Eksempel 12

Den alkoholuløselige, kefalinanrikkede fosfatidfraksjon fra eksempel 6 (100 g) ble dispergert i aceton (50 ml, + 2 % vann), eddiksyreanhydrid (2,75 g) og trietylamin (6,5 g) ble tilsatt til dispersjonen og blandingen rystet i 10 minutter ved romtemperatur (20°). En test viste at en 1 % dispersjon av reaksjonsblanding i vann hadde pH 9,6. TLC-analyse på silika med en blanding av kloroform, metanol og vann (65 : 25 : 4 i volumforhold) viste fravær av ninhydrin-positive substanser og fravær av uacylert kefalin.

Den acetylerede blanding ble innført i løpet av 10 minutter i kraftig omrørt aceton (1000 ml) som inneholdt 10 ml vann og butylert kresol (100 mg) som antioksydasjonsmiddel, og blandingen ble rørt i ytterligere 15 minutter og deretter filtrert. Filtreringsresten ble suspendert i aceton (500 ml, 5 ml vann) som inneholdt butylert kresol (50 mg), ble omrørt og filtrert. Denne vaskeoperasjon ble gjentatt med løsningsmidlet ved $40-50^{\circ}$ og den endelige rest tørket ved romtemperatur under redusert trykk.

Produktet (40,3 g) viste seg ved TLC-analyse å inneholde spor av acetylkefalin, men intet kefalin.

Eksempel 13

Sojafosfatid-utgangsmaterialet fra eksempel 6 (50 g) ble suspendert i metylacetat (50 ml) og eddiksyreanhydrid (1,38 g) og trietylamin (3,25 g) tilsatt. Blandingen ble rystet i 10 minutter ved 18-20°. Produktet ble underkastet TLC-analyse og viste fravær av ninhydrin-positivt materiale, hvilket indikerte at acetyleringen var fullstendig.

Den acetylerede blanding (som var tilstrekkelig basisk til å gi pH over 9 i en 1 % vandig dispersjon) ble tilsatt i løpet av 10 minutter til kraftig omrørt metylacetat (500 ml) og rørt i ytterligere 15 minutter. Det uløselige materiale ble avfiltrert og resten igjen suspendert i metylacetat (250 ml), rørt i 15 minutter og suspensjonen filtrert igjen. Denne ekstraksjon ble gjentatt med metylacetat ved 50-55° (250 ml), og man fikk en mørk gummi som ble tørket i vakuum ved romtemperatur, hvilket ga som utbytte et mørk brunt, sprødt, fast stoff (25,1 g). TLC-analyse viste nærvær av små mengder acylkefalin, men intet kefalin.

Eksempel 14

Til den alkoholuløselige fraksjon av sojafosfatid fra eksempel 6 (100 g) ble det tilsatt aceton (15 ml), blandingen omrørt til den var homogen og deretter helt i aceton (1000 ml, med 20 ml vann). Det utfelte ble filtrert av, filtratet som inneholdt fett ble kastet, og det utfelte resuspendert i aceton (200 ml, med 4 ml vann). Til den omrørte suspensjon ble tilsatt trietylamin (6,5 g, tilstrekkelig til å gi den endelige reaksjonsblanding en alkalitet som tilsvarte pH over 9 i vandig dispersjon) og eddiksyreanhydrid (2,75 ml), og blandingen ble rørt ved romtemperatur i 30 minutter og filtrert. Resten ble ekstrahert to ganger med aceton (200 ml, med 4 ml vann), idet den første ekstraksjon ble foretatt ved romtemperatur og den andre ved 50°, hvorefter det ble tørket under redusert trykk og ved 35°, og man fikk et produkt (48 g) som inneholdt bare en liten mengde N-acetylkefalin.

Eksempel 15

Den alkoholuløselige, avfattede fosfatidfraksjon fra eksempel 5 (10 g), ftalsyreanhydrid (2,8 g) og trietylamin (10 ml, tilstrekkelig til å gi de nødvendige basiske betingelser) ble sammen oppløst i kloroform (30 ml), og løsningen hensatt ved omgivelsestemperatur i 15 minutter. TLC-analyse viste at blandingen da inneholdt intet fritt kefalin. Løsningsmidlet ble fjernet ved fordampning og resten ekstrahert 3 ganger med aceton (100 ml, med

2 ml vann) ved omgivelsestemperatur. Den uløselige rest ble tørket under redusert trykk, og man fikk et produkt (5,9 g) som ved TLC-analyse viste seg å være praktisk talt fri for kefalin og o-karboksybenzoylkefalin. Acetonekstrakten ga ved inndampning et gummiaktig o-karboksybenzoylkefalin.

Det således oppnådde gummiaktige produkt (10 g) ble kromatografert på en nøytral silikagelkolonne og kolonnen eluert først med kloroform og deretter med kloroform som inneholdt 10% metanol. Fra eluatet ble isolert o-karboksybenzoylkefalin (3,73 g) som et fast stoff. Til dette ble tilsatt eddiksyreanhydrid (3 ml) og kloroform (30 ml), hvorefter den løsning som hadde dannet seg, ble hensatt i 30 minutter. TLC-analyse av blandingen viste da at ringslutning til ftalimidoforbindelsen N-ftaloylkefalin var fullstendig. Blandingene ble inndampet til tørrhet under redusert trykk, hydrazinhydrat (0,6 g) i etanol (30 ml) tilsatt, løsningen oppvarmet under mild tilbakeløpskjøling i 2 timer og det avkjølte produkt undersøkt ved TLC-analyse, som viste at det bestod av fritt kefalin.

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåte for fremstilling av adskilte fosfatider, hvor en fosfatidblanding som omfatter N-acylerbare og ikke-N-acylerbare fosfatider, omsettes med et acyleringsmiddel for å omdanne det N-acylerbare fosfatid til N-acylfosfatid, og hvor reaksjonsproduktet ekstraheres med løsningsmiddel, k a r a k t e r i s e r t ved at blandingen gjøres basisk med en nitrogenbase med pKa minst 9 til den tilsvarende en pH-verdi på minst 8,5 under vanlige betingelser, og ved at blandingen løsningsmiddelekstraheres med aceton eller metylacetat.
2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t ved at nitrogenbasen er et trialkylamin, og at acyleringen utføres i nærvær av dette som katalysator.
3. Fremgangsmåte som angitt i krav 2, k a r a k t e r i s e r t ved at acyleringen og løsningsmiddelekstraksjonen utføres samtidig.
4. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t ved at acyleringen utføres uten katalysator, og at nitrogenbasen tilsettes til acyleringsblandingen før uomsatt acyleringsmiddel skilles fra den.