



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **264 023 A1**4(51) C 12 N 1/14
C 12 P 1/02**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 305 083 0	(22)	17.07.87	(44)	18.01.89
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Gartz, Jochen, Dr. rer. nat., DD

(54)	Verfahren zur Extraktion von Indolalkaloiden aus Pilzmaterial
------	--

(55) Indolalkaloide, Psilocybin, Baeocystin, Psilocin, Psilocybe, Extraktion, Conocybe, Pluteus, Panaeolus, Inocybe
 (57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung der Indolalkaloide Psilocybin, Baeocystin und Psilocin durch Extraktion der Mycelien und Fruchtkörper höherer Pilze. Die Wirkstoffe sind als Modellsbstanz in der neurobiologischen Forschung anwendbar. Die Alkaloide werden aus den getrockneten und pulverisierten Biomassen unter Rühren mit verdünnter Essigsäure in die wäßrige Phase überführt, wobei ohne weitere Extraktion eine chromatographische Gewinnung der Wirkstoffe sich anschließt und eine nachfolgende Behandlung der einzelnen Fraktionen mit Silbercarbonat im Gegensatz zu bekannten Verfahren entfällt.

Patentanspruch:

1. Verfahren zur Extraktion von Indolalkaloiden aus Pilzmaterial von Arten der Gattung Psilocybe, Conocybe, Panaeolus, Inocybe und Panaeolus, **dadurch gekennzeichnet**, daß Psilocybin, Baeocystin und Psilocin aus den getrockneten und pulverisierten Mycelien und/oder Fruchtkörpern mit wäßriger Essigsäure extrahiert werden und danach die Reindarstellung der Wirkstoffe chromatographisch auf bekannte Weise erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Extraktion mit der 10 bis 20fachen Menge an wäßriger Säure mit 1 bis 30% Essigsäureanteil im Lösungsmittelgemisch jeweils dreimal erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß, je nach Pilzart und Trocknungsart, die Extraktion der Biomassen bei 0 bis 50°C innerhalb von 0,5 bis 10 Stunden erfolgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Extraktion von Indolalkaloiden aus natürlichen oder künstlich kultivierten Pilzmaterial durch Anwendung geeigneter Lösungsmittel.

Die Indolalkaloide sind in der neurobiologischen Forschung als Modellsubstanzen anwendbar.

Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

Die Indolalkaloide Psilocybin, Psilocin und Baeocystin sind in natürlich vorkommenden, höheren Pilzen der Gattung Psilocybe, Conocybe, Panaeolus, Inocybe und Pluteus in verschiedenen Arten nachweisbar.

Sie sind auch durch künstliche Anzucht der betreffenden Pilzarten als Mycelien und/oder Fruchtkörpern zugänglich.

Zur Gewinnung dieser Wirkstoffe aus dem Pilzmaterial wird eine Extraktion der trockenen Biomassen mit Methanol oder mit 80%igem Ethanol beschrieben, nach Entfettung der Extrakte mit Petrolether schießt sich dann eine chromatographische Auftrennung der Indolalkaloide an (DE 1087321).

Das beschriebene Verfahren hat mehrere Nachteile. Durch die Anwendung der Alkohole als Extraktionsmittel werden Lipide und weitere unbekannte Substanzen ebenfalls aus den Biomassen mitextrahiert. Dadurch muß nachfolgend eine Behandlung des Extraktionsproduktes mit Petrolether erfolgen. Weiterhin bewirken weitere, so nicht abtrennbare Begleitsubstanzen, daß auch nach der chromatographischen Reinigung oft eine Kristallisation der Indolalkaloide nicht erreicht werden kann. Deshalb beschreibt das zitierte Verfahren in den Anwendungsbeispielen eine abschließende Behandlung der amorphen, abgetrennten Alkaloide mit dem teuren Silbercarbonat, um eine Kristallisation zu erreichen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein einfaches und wenig aufwendiges Verfahren zur Extraktion von Indolalkaloiden aus Pilzmaterial zu entwickeln, bei dem keine Lipide und weitere Substanzen, die die Reindarstellung stören, mitextrahiert werden und die Kristallisation der Wirkstoffe ohne Anwendung des Silbercarbonates erfolgen kann.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, solche Lösungsmittel zur Extraktion der Indolalkaloide auszuwählen, die eine erschöpfende und schnelle Abtrennung der Alkaloide von Pilzmaterial unter Vermeidung der zusätzlichen Extraktion störender Begleitsubstanzen gewährleisten.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, indem ein Gemisch aus Essigsäure und Wasser als Extraktionsmittel der Indolalkaloide aus dem Pilzmaterial verwendet wird. Die Essigsäurekonzentrationen liegen dabei im Bereich von 1 bis 30%, wobei in einem Temperaturbereich von 0 bis 50°C gearbeitet wird. Durch den hohen Wasseranteil im Gemisch bleiben die störenden Begleitsubstanzen weitgehend im Pilzmaterial, während die Essigsäure die polaren Indolalkaloiden leicht herauslöst.

Bei der Extraktion wird das trockene und fein gepulverte Pilzmaterial unter Rühren jeweils mit der 10 bis 20fachen Menge an Extraktionsmischung mehrere Stunden dreimal extrahiert. Die Extraktionszeit und -temperatur richtet sich dabei nach der entsprechenden Pilzart und den Trocknungsbedingungen, die Extraktion aus gefriergetrocknetem Material erfolgt schneller und unter milderer Bedingungen.

Durch Eindampfen der vereinigten Extrakte bei 50°C i. Vak. und nachfolgender Chromatographie nach bekannten Verfahren, z. B. durch Säulenchromatographie an Cellulosepulver mit wassergesättigtem n-Butanol als Eluent lassen sich die Indolalkaloide kristallin und rein darstellen, wobei die Nachteile der bekannten Extraktion mit Alkoholen entfallen.

Die Erfindung soll durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:

Zu 24 g der gefriergetrockneten und feingepulverten Fruchtkörper der *Psilocybe cubensis* (Earle) Sing., die auf einem Nährboden aus 200 g Reiskörnern und 400 ml Wasser innerhalb von 12 Wochen kultiviert wurde, wurden 400 g 10%ige Essigsäure gegeben. Nach 5 Std. Rühren der Mischung bei 20°C wurde filtriert und die Biomasse noch 2mal analog extrahiert. Die vereinigten und i. Vak. bei 50°C eingedunsteten Extrakte wurden dann an einer 30 cm Säule mit Cellulosepulverfüllung mit wassergesättigtem n-Butanol chromatographiert. Die psilocybinhaltigen Fraktionen (DC) wurden i. Vak. bei 50°C eingedunstet und die Substanz aus wenig Methanol umkristallisiert. Eine andere Fraktion lieferte bei gleicher Aufarbeitung wenig Psilocin.

Ausbeute an Psilocybin: 0,3%

Ausbeute an Psilocin: 0,1%

Beispiel 2:

10 g der bei 20°C an der Luft getrockneten und pulverisierten Fruchtkörper der *Psilocybe semilanceata* (Fr.) Kumm. eines natürlichen Standortes wurden mit 200 g 15%iger Essigsäure 3 Std. bei 40°C unter Rühren extrahiert. Nach Abtrennung und nachfolgender, zweimaliger weiterer Extraktion des Pilzmaterials wurden die Lösungen bei 50°C i. Vak. eingedampft. Nach Auflösen des Rückstandes in 10 ml einer Mischung aus n-Propanol/Wasser/Essigsäure (10:3:3) wurde an einer 30 cm Säule mit Kieselfüllung chromatographiert. Die Psilocybin bzw. Baeocystin enthaltenden Faktoren wurden jeweils eingedunstet und beide Wirkstoffe aus wenig Methanol umkristallisiert.

Ausbeute an Psilocybin: 0,5%

Ausbeute an Baeocystin: 0,1%

Beispiel 3:

50 g der gefriergetrockneten Mycelien der *Psilocybe cubensis* (Earle) Sing., die als Oberflächenkultur auf 6%igen Malzextraktlösungen unter Zusatz von 0,2% Agar und 100 mg KH_2PO_4 nach 40 Tagen Kultivierung bei 22°C erhalten wurden, ergaben bei analoger Extraktion, wie im Beispiel 1 bei den Fruchtkörpern beschrieben wurde, eine Ausbeute von 0,1% an Psilocybin. In den Mycelien waren keine weiteren Indolalkaloide nachweisbar.