



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

216997 ✓

(11)

(B1)

(51) Int. Cl³

C 07 D 311/40

(22) Přihlášeno 14 07 80
(21) (PV 4980-80)

(40) Zveřejněno 26 02 82

(45) Vydáno 15 02 85

(75)

Autor vynálezu

PROCHÁZKA VLADIMÍR RNDr. CSc., ŠTĚRBA JIŘÍ PhMr., PRAHA,
KOLÁŘOVÁ HANA ing., STARÁ BOLESLAV, HORÁK PAVEL RNDr. CSc., PRAHA,
STUHLÍK JOSEF ing., HRABYNĚ, CVAK LADISLAV ing.,
KRAJČÍČEK ALOIS PhMr., SPÁČIL JIŘÍ PhMr., OPAVA

(54) Způsob izolace silymarinového komplexu

Způsob izolace silymarinového komplexu z plodů ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* /L./ Gaertn.) extrakcí vodným etanolem za zvýšené teploty nebo vodným acetonem za normální až mírně zvýšené teploty, zahuštěním extraktu a převedením látek do 60 % obj. vodného etanolu, odtučením roztoku nepolárním organickým rozpouštědlem, jako petroléterem nebo benzinem a následnou extrakcí silymarinu chloroformem. Ze zahuštěného chloroformového extraktu se silymarinový komplex vyloučí zředěním vodou.

Vynález se týká způsobu izolace silymarinu, komplexu flavonoidních látek, tzv. flavolignanů, odvozených od flavanonolu taxifolinu a obsažených v plodech (nažkách) ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* /L./ Gaertn.). Tento komplex se používá jako léčivo různých onemocnění jater. Vyznačuje se stimulačním účinkem na metabolismus jaterních buněk a ochranným působením na jejich membrány (G. Vogel se sp., *Arzneimittel-Forsch.* 25, 82, 1975). Nositelem účinku jsou zejména izomerní sloučeniny silybin, silydianin a silychristin, které tvoří podstatnou složku zmíněného komplexu.

Získávání silymarinu z plodů ostropestřce je mimořádně ztíženo třemi činiteli: prvním z nich je vysoký obsah oleje v droze, až 30 % hmotn., druhým je pevná vazba silymarinu v buňce a z toho vyplývající pomalé difúze do extrakčního činidla; silymarin je obsažen výhradně v povrchových částech nažek, zatímco veškerý olej je spolu se škrobovými zrny obsažen v endospermu. Třetím činitelem je nepatrný výběr purifikačních metod. Rozpustnost silymarinu je omezena na několik polárních rozpouštědel, amorfní charakter komplexu umožňuje pouze srážecí purifikační postupy; acidobazických zásahů nelze použít pro citlivost flavolignanů.

Při teoretických pracích, zabývajících se chemickou povahou silymarinu a později i jeho složek, nebylo nutno brát zřetel na pracnost a zdoluhavost izolačního postupu. Zpravidla byl jemně mletý rostlinný materiál nejprve pečlivě odtučňován nepolárním organickým rozpouštědlem a poté dlouhodobě extrahován octanem etylnatým nebo acetonem (B. Janiak, R. Hänsel, *Planta Medica* 9, 71, 1960; H. Wagner se sp., *Naturwissenschaften* 52, 305, 1965). Pro průmyslové účely bylo však nutno eliminovat nebo alespoň technologicky upravit předběžné odtučňování drogy a urychlit extrakci silymarinu. Podle těchto kritérií lze rozdělit dosavadní postupy, většinou patentově chráněné. V některých je odtučňování drogy vynecháno a mletý materiál se extrahuje acetonem (francouzský pat. spis č. 2 181 188), směsí octan etylnatý-metanol-voda (belgický pat. spis č. 766 228), kombinací polyetylenglykolu 200 s etanolem nebo acetonem (NSR pat. spis č. 2 017 789) nebo následně několika rozpouštědly eluotropní řady (japonský pat. spis č. 8 091 211). Hlavní část vyextrahovaného oleje se zpravidla oddělí po zředění zahuštěného výluhu vodou. Dále bylo popsáno odtučňování jemně mleté drogy dichlormetanem, následná extrakce acetonem a rafinace silymarinového souhrnu na práškovém polyamidu (NDR pat. spis č. 112 261).

Podle dalšího způsobu se zbavují celé plody většiny oleje lisováním, čímž se zároveň naruší buňky a usnadní následná extrakce. Rozdrcený materiál se pak extrahuje octanem etylnatým. Odpařením získaný koncentrát se zbavuje zbytků oleje a též obohacuje protiproudým rozdělováním v soustavě petroléter-metanol-voda na řadě průtokových separátorů (NSR pat. spisy č. 1 767 666 a 1 923 082; čs. pat. spis č. 162 722). Ve finální substanci silymarinu je po tomto izolačním postupu deklarován obsah 70 až 80 % hmot. flavonoidů silymarinového typu.

Rozborem a přesnou reprodukcí dosud známých způsobů přípravy silymarinu bylo zjištěno, že z neodtučněné drogy lze silymarin uspokojivě extrahovat buď ketonickým rozpouštědlem (acetonem) nebo směsí organických rozpouštědel s širokým rozsahem dielektrických konstant, čímž je umožněn přístup extrakčního média do částic drogy i za přítomnosti tuků. V žádném případě nebyl prokázán příznivý vliv tuků na extrakci silymarinu, zmíněný ve francouzském pat. spise č. 2 181 188.

Nevýhodami známých způsobů jsou buď poměrně vysoká cena nebo špatná dostupnost rozpouštědla (polyetylenglykol), dále pak obtížná regenerace extrakčního média v případě kombinací rozpouštědel. V dalším případě je předběžné odlisování většiny oleje výhodné, následná extrakce octanem etylnatým je však značně neselektivní a kromě toho se octan etylnatý při extrakci a zahušťování výluhu rozkládá. Složitý výsledný systém octan etylnatý-kyselina octová-etanol pak extrahuje z drogy i řadu obtížných balastních látek. Rovněž spotřeba rozpouštědel a nákladnost zařízení na protiproudé obohacování silymarinového koncentráту nejsou úměrné výsledku rafinace.

Problematicu extrakce drogy a obohacování silymarinového souhrnu částečně řeší postup (polské pat. spisy č. 89 368 a 97 285), který využívá možnosti odlisovat část oleje ze zvlhčených a nabobtnalých nážek nebo zpracovat odděleně oloupané povrchové části plodů a endosperm. Tímto postupem se silymarin extrahuje z částečně odtučněného materiálu nebo z povrchových částí plodů 90% vodným metanolem, zahuštěný extrakt se odtuční benzinem, sráží vodou a vysušený meziprodukt se obohacuje extrakcí dichlormetanem nebo acetonem. Nevýhodou tohoto postupu je poměrně složitá úprava drogy před vlastní extrakcí silymarinu, například mačkání nabobtnalých nážek, lisování za tepla, mletí, síťování a konečně technologicky nejisté obohacování silymarinového koncentráту extrakcí pevné substance organickým rozpouštědlem.

Uvedené nevýhody dosavadních metod se podařilo odstranit vypracováním způsobu izolace silymarinu z plodů ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* /L./ Gaertn.) podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se celé drcené plody nebo jejich oddělené povrchové části extrahují buď vodným etanolem v koncentraci 80 až 90 % obj. při teplotě od 50 °C až k teplotě varu extrakčního činidla nebo vodným acetonem v koncentraci 90 až 98 % obj. při teplotě 15 až 35 °C, extrakt se po zpracování na olejovitý odparek převede na roztok silymarinového komplexu v 50 až 60% vodném etanolu, roztok se zbaví oleje extrakcí nepolárním organickým rozpouštědlem, s výhodou petroléterem, načež se vodně-etanolicí fáze extrahuje organickým rozpouštědlem ze skupiny chlorovaných uhlovodíků, s výhodou chloroformem, extrakt se zahustí na 10 až 20 % svého původního objemu a z tohoto koncentrátu se zředěním vodou vyloučí silymarinový komplex.

Extrakce výchozí drogy se účelně provádí vodným etanolem o koncentraci 80 až 90 % obj. v poměru 1:8 až 1:12, s výhodou 1:10 (hmotnost/objem) nebo vodným acetonem o koncentraci 90 až 98 % obj. v poměru 1:4 až 1:10, s výhodou 1:5 až 1:7 (hmotnost/objem). Při vypracovávání způsobu podle vynálezu se vycházelo z nových poznatků a zkušeností ze všech výrobních stupňů. V počáteční fázi je důležité, aby se droga příliš nedrtila; silymarin je totiž obsažen výhradně v povrchových částech plodů. Tím se zabrání uvolnění škrobu z vnitřních částí plodů, poněvadž jinak uvolněný škrob značně zpomaluje průtok rozpouštědla drogou. Pro další postup a výsledek je pak v podstatě lhostejné, zda se používá částečně odtučněné nebo neodtučněné drogy, rozmáčkanych plodů nebo oddělených obalů. Důležité je rozrušit vhodným způsobem buňky obsahující silymarin.

Z ekonomických důvodů je žádoucí, aby bylo možno drogu extrahovat levným a dostupným rozpouštědlem, které lze snadno regenerovat. Extrakt musí být dále zpracovatelný jednoduchým, reprodukovatelným a technologicky čistým způsobem. Jak bylo experimentálně ověřeno, je nejvýhodnější extrakce 80 až 90% vodným etanolem za zvýšené teploty nebo obdobně účinná extrakce 90 až 98% vodným acetonem bez zahřívání.

Při přečišťování extraktu je důležité udržovat silymarinový komplex až do stádia finální substance v takových podmínkách, aby nedošlo k vyloučení vazké pryskyřičné hmoty, s níž je vždy obtížná manipulace v provozním měřítku. Vlastní obohacování je pak nejlépe provádět na principu rozdělovacích rovnováh v systému kapalina-kapalina. Oba tyto požadavky jsou v postupu dle vynálezu splněny. Jako velmi výhodný systém rozpouštědel pro obohacení silymarinového komplexu se ukázala směs jednosytného vodného alkoholu s chlorovaným uhlovodíkem, s výhodou směs etanol-voda-chloroform. Obohacený silymarinový komplex přitom přechází do těžké (chloroformové) fáze soustavy, polární balastní látky a zejména pigmenty zůstávají v lehké fázi.

Při přípravě finální substance lze těžkou fázi zahustit až na viskózní homogenní roztok, který poskytne známým způsobem rozmícháním s nadbytkem studené vody hrubou, dobře filtrovatelnou suspenzi. Vysušením, nejlépe ve vakuu při teplotě do 30 °C, se získá silymarinový komplex vhodných fyzikálních vlastností, prostý zbytků organických rozpouštědel, s obsahem nejméně 70 % hmot. flavolignanů stanoveno fotometrickou metodou dle Wagnera se sp. (Arzneimittel-Forsch. 18, 696, 1968). Tento koncový stupeň je velmi důležitý. Zkuše-

nost ukázala, že silymarin srážený v prostředí organických rozpouštědel nebo promývaný těmito rozpouštědly poutá velmi silně jejich zbytky i při intenzivním sušení ve vakuu. Tím je odstraněna nevýhoda postupu podle cit. polských pat. spisů, při němž je souhrn obohacován ve formě pevné substance acetonem nebo dichlormetanem.

Volba média pro extrakci drogy je při způsobu podle vynálezu do určité míry dána rafinačním postupem, který bude v dalším blíže popsán. Rozdělovací koeficient silymarinu (flavolignanů) i rafinační efekt je totiž výrazně příznivý právě v soustavě etanol-voda-chloroform. Z řady koncentračních i teplotních závislostí vyplynuly optimální podmínky pro extrakci, a to vodný etanol v koncentraci 80 až 90 % obj. a teplota od 50 °C až k teplotě varu extrakčního činidla, výhodně 55 až 60 °C. K extrakci stačí obvykle 10 objemových dílů extrakčního činidla na 1 hmotnostní díl výchozí drogy, přičemž extrahovat se může kontinuálně (protiproudě) nebo vsádkově. V tomto případě je nejlépe extrahovat dvakrát po 5 objemových dílech rozpouštědla, za míchání, vždy po dobu 5 hodin. Není-li proveditelná extrakce drogy za tepla, lze nahradit vodný etanol 90 až 98% vodným acetonem. K extrakci stačí obvykle 5 až 7 objemových dílů extrakčního činidla na 1 hmotnostní díl výchozí drogy. Po oddestilování acetonu se získaný koncentrát obohacuje dále již shodným postupem v soustavě etanol-voda-chloroform.

Vodně-etanolický extrakt neodtučněné hrubě drcené drogy představuje po zahuštění v poměru 1:10 hnědý viskózní roztok, obsahující asi 60 % obj. etanolu a částečně vyloučený olej. Ke kvantitativnímu odstranění oleje postačuje vytřepat koncentrát několikrát (například třikrát) petroléterem, v množství například 0,2 obj. dílu, vztaženo na objem koncentráту. Je vhodné stanovit předtím koncentraci etanolu a upravit ji na hodnotu 60 % obj., která je optimální pro následné vytřepávání silymarinu. Odtučněný koncentrát stačí vytřepat jednou 0,2 obj. dílu a dvakrát po 0,1 obj. dílu chloroformu, přičemž výsledný objem spojených vytřepů je více než dvojnásobkem objemu použitého chloroformu. Chloroform lze nahradit i jiným chlorovaným uhlovodíkem, například levným a snadno dostupným 1,2-dichlorethanem, jeho spotřeba je však 2,5krát větší.

Vodně-acetonový extrakt poskytne po oddestilování acetonu koncentrát, který se přímo v destilační nádobě rozpustí v takovém objemu 60% vodného etanolu, který odpovídá hmotnosti výchozí drogy. Získaný roztok se pak vytřepává chloroformem popsaným způsobem.

Podrobnosti způsobu podle vynálezu jsou patrné z následujících příkladů provedení, které tento způsob pouze ilustrují, ale nijak neomezuji.

P ř í k l a d 1

100 kg hrubě drcených plodů ostropestřce mariánského, o velikosti částic 0,5 až 2,0 milimetrů, se extrahuje 500 litry 80% vodného etanolu za míchání při teplotě 55 až 60 °C po dobu 5 hodin. Extrakt se oddělí a droga se vyluhuje stejným způsobem ještě jednou stejným objemem vodného etanolu. Je-li k dispozici zařízení na protiproudou extrakci za tepla, lze drogu při uvedené teplotě extrahovat takovou rychlostí, aby doba styku rozpouštědla s drogou byla 10 až 12 hodin. Extrakt se zahustí za sníženého tlaku na objem 90 až 100 litrů (tj. v poměru asi 1:10). Destilát se po úpravě koncentrace etanolu na 80 % obj. použije k další extrakci. V koncentráту se stanoví vhodnou metodou, například destilační zkouškou nebo plynovou chromatografií, obsah etanolu a upraví se na 60 % obj. Tmavohnědý roztok, obsahující částečně vyloučený olej, se extrahuje třikrát po 20 litrech petroléteru. Ze spojených extraktů se regeneruje petroléter. Vodně-etanolická fáze zbavená oleje se extrahuje třemi podíly chloroformu o objemech 20, 10 a 10 litrů, přičemž většina hnědých balastních látek zůstane ve vrchní fázi soustavy. Spojené spodní fáze, zbarvené světle hnědočerveně, mají objem kolem 100 litrů. Zahustí se za sníženého tlaku na 10 litrů, tj. na 1/10 navážky drogy (objem/hmotnost) a koncentrát se za míchání vypustí během 15 až 30 minut do 60 litrů vody o teplotě do 25 °C. Vzniklá suspenze se odsaje přes tkaninu, promyje vodou a suší.

ve vakuu při vnější teplotě zprvu do 40 °C, po odpaření hlavního podílu vody postupně až do 60 °C. Poslední fázi sušení lze realizovat též v teplovzdušné sušárně.

Získaný silymarinový komplex je béžový prášek, obsahující nejméně 70 % hmot. flavolignanů, stanoveno metodou dle Wagnera se sp. (Arzneimittel-Forsch., již citováno). Výtěžek je 3 650 g.

P ř í k l a d 2

100 kg oloupaných povrchových částí plodů ostropestřce mariánského se extrahuje dvakrát po 500 litrech 80% vodného etanolu jako v příkladu 1. Extrakt se v tomto případě zahustí na 200 až 300 litrů, neboť obsahuje více silymarinu, který by se mohl předčasně vyloučit jako pryskyřice. K odstranění zbytků oleje stačí dvojnásobná extrakce po 20 litrech petroléteru. Vodně-etanolická fáze o koncentraci 60 % obj. etanolu se extrahuje třemi podíly chloroformu o objemech 40, 20 a 20 litrů. Spodní fáze se zahustí na 20 litrů a koncentrát se sráží 120 litry vody. Další zpracování je jako v příkladu 1.

Získaný silymarinový komplex je stejné kvality jako v příkladu 1. Výtěžek je 7 000 g.

P ř í k l a d 3

100 kg hrubě drcených plodů ostropestřce mariánského o velikosti částic 0,5 až 2,0 mm se extrahuje dvakrát po 350 až 500 litrech 95% vodného acetonu za míchání při teplotě 25 °C, vždy po dobu 5 hodin. Spojené výluhy se zahustí za sníženého tlaku na olejovitý odparek, který se rozmíchá s 90 litry 60% vodného etanolu. Tento roztok se vytřepává petroléterem a chloroformem a dále zpracovává jako v příkladu 1. Výtěžek je 4 080 g.

P Ř E D M Ě T V Ý N Á L E Z U

1. Způsob izolace silymarinového komplexu z plodů ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* /L./ Gaertn.) vyznačující se tím, že se buď celé drcené plody nebo jejich oddělené povrchové části extrahují vodným etanolem o koncentraci 80 až 90 % obj. při teplotě od 50 °C až k teplotě varu extrakčního činidla nebo vodným acetonem o koncentraci 90 až 98 % obj. při teplotě 15 až 35 °C, extrakt se po zpracování na olejovitý odparek převádí na roztok silymarinového komplexu v 50 až 60% vodném etanolu, roztok se zbaví oleje extrakcí nepolárním organickým rozpouštědlem, s výhodou petroléterem, načež se vodně-etanolická fáze extrahuje organickým rozpouštědlem ze skupiny chlorovaných uhlovodíků, s výhodou chloroformem, extrakt se zahustí na 10 až 20 % svého původního objemu a z tohoto koncentráту se zředěním vodou vyloučí silymarinový komplex.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se extrakce výchozí drogy provádí vodným etanolem o koncentraci 80 až 90 % obj. v poměru 1:8 až 1:12, s výhodou 1:10 (hmotnost/objem) nebo vodným acetonem o koncentraci 90 až 98 % obj. v poměru 1:4 až 1:10, s výhodou 1:5 až 1:7 (hmotnost/objem).