



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 02.03.76 (P. 187670)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 26.09.77

Opis patentowy opublikowano: 31.01.1979

CIĘTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Int. Cl.² A61K 37/26

Twórcy wynalazku: Kazimierz Dziegielewski, Halina Cieślak-Figurska,
Krzysztof Bujnowski, Jerzy Gębski, Wiesław Drze-
miński, Marian Kochanowski, Henryk Piotrowski,
Hanna Królak, Leszek Drogowski

Uprawniony z patentu: Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polf”,
Warszawa (Polska)

Sposób otrzymywania insuliny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania insuliny metodą ekstrakcji trzustki.

Znane sposoby otrzymywania insuliny polegają na ekstrakcji rozdrobnionych gruczołów trzustkowych zakwaszoną mieszaniną wody i alkoholu, usunięciu tkanki trzustkowej przez filtrację lub wirowanie, oczyszczeniu surowego ekstraktu w środowisku kwaśnym i alkalicznym celem wytrącenia substancji balastowych, zagęszczeniu oczyszczonego ekstraktu, wysoleniu insuliny i krystalizacji.

Szczególnie trudnym do przeprowadzenia etapem tego procesu jest oddzielanie rozdrobnionej tkanki trzustkowej po procesie ekstrakcji, gdyż subtelnie rozdrobniona miazga trzustkowa o małych wymiarach cząstek w znacznym stopniu utrudnia, a czasem wręcz uniemożliwia skuteczne i szybkie przeprowadzenie filtracji lub wirowania. Szybkoobrotowe mieszadła tnące, stosowane w procesach przemysłowych do rozdrabniania trzustki podczas ekstrakcji (na przykład mieszadła typu Turrax), powodują powstawanie dużych ilości miazgi komórkowej, co stanowi dodatkową przeszkodę w oddzielaniu tkanki trzustkowej.

Z opisu patentowego ZSRR nr 332 832 znany jest sposób otrzymywania insuliny z trzustki, polegający na tym, że z mieszaniny poekstrakcyjnej oddziela się tkankę trzustkową, a następnie do otrzymanego ekstraktu dodaje się chlorek wapniowy przy wartości pH=3,3—3,5, osad oddziela

2

się, a przesącz traktuje się roztworem NaOH do osiągnięcia wartości pH=4,3—5,3 i po powtórnym oddzieleniu osadu z oczyszczonego ekstraktu wyodrębnia się insulinę znanymi metodami.

5 Sposób według wynalazku polega na tym, że z mieszaniny poekstrakcyjnej oddziela się tkankę trzustkową w obecności trudno rozpuszczalnych w wodzie soli metali ziem alkalicznych przy wartości pH=2,0—4,0, otrzymany ekstrakt oczyszcza się
10 przy wartości pH=6,0—7,5, wytrącony osad oddziela się, a z ekstraktu usuwa się alkohol i wyodrębnia się insulinę znanymi metodami, przy czym trudno rozpuszczalne sole metali ziem alkalicznych stanowią pomoc filtracyjną, która umożliwia szybkie i dokładne oddzielenie tkanki trzustkowej. Szczególnie dobre wyniki daje wytrącanie
15 trudno rozpuszczalnych soli metali ziem alkalicznych bezpośrednio w mieszaninie poekstrakcyjnej, zawierającej tkankę trzustkową. W tym celu do mieszaniny poekstrakcyjnej, zawierającej aniony kwasów, które tworzą z metalami ziem alkalicznych sole trudno rozpuszczalne w wodzie, dodaje się łatwo rozpuszczalne w wodzie sole tych metali, na przykład chlorki, lub ich roztwory wodne.
20 Jeśli mieszanina poekstrakcyjna nie zawiera anionów wymienionych kwasów, to dodaje się także te kwasy lub ich łatwo rozpuszczalne w wodzie sole, na przykład amonowe, względnie roztwory wodne tych kwasów lub ich soli.

30 Jako trudno rozpuszczalne sole metali ziem al-

kalicznych stosuje się sole takie, jak na przykład fosforany, siarczany, szczawiany lub ich mieszaniny. Korzystnie stosuje się fosforan wapniowy.

Przy otrzymywaniu insuliny sposobem według wynalazku korzystnie stosuje się specyficzną metodę rozdrabniania gruczołów trzustkowych, pozwalającą na dalsze przyspieszenie i polepszenie procesu oddzielania tkanki trzustkowej. Metoda ta polega na rozdrabnianiu trzustki w sposób jednorazowy i krótkotrwały w środowisku rozpuszczalnika ekstrahującego insulinę (zakwaszona mieszanina wody i alkoholu etylowego), ale przed właściwym procesem ekstrakcji, dzięki czemu można uzyskać równomierne rozdrobnienie tkanki z ograniczeniem do minimum ilości miazgi komórkowej. Efekt jednolitego i dokładnego rozdrobnienia trzustki przed właściwym procesem ekstrakcji można osiągnąć przez zastosowanie urządzenia, w którym trzustka i rozpuszczalnik ekstrahujący spotykają się z równoczesnym rozdrabnianiem tkanki trzustkowej, lub w którym rozdrabnianie zachodzi podczas przepływu mieszaniny rozpuszczalnika ekstrahującego i wstępnie rozdrobnionej trzustki przez urządzenie rozdrabniające. Właściwą ekstrakcję insuliny z trzustki, znajdującej się w mieszaninie, która opuszcza urządzenie rozdrabniające, przeprowadza się następnie w oddzielnym urządzeniu bez dalszego rozdrabniania materiału trzustkowego.

Proces otrzymywania insuliny sposobem według wynalazku można prowadzić w sposób ciągły.

Sposób według wynalazku jest objaśniony następującymi przykładami:

Przykład I. W reaktorze umieszcza się 500 l 85%-owego etanolu i 200 kg wstępnie rozdrobnionej trzustki wieprzowej, włącza się mieszadło tnące, koryguje wartość pH mieszaniny za pomocą kwasu fosforowego do 3,0 i prowadzi ekstrakcję przez 2,5 godziny w temperaturze $+15^{\circ}\text{C}$. Tkanek poekstrakcyjną oddziela się na separatorze i dokonuje ekstrakcji wtórnej w takich samych warunkach. Do połączonych ekstraktów trzustkowych, zawierających insulinę oraz około 50% wyjściowej ilości trzustki o stopniu rozdrobnienia, umożliwiającym oddzielenie jej na separatorze, dodaje się 15 litrów 50%-owego wodnego roztworu chlorku wapniowego i oddziela się osad na próżniowym filtrze obrotowym. Klarowny przesącz zobojętnia się 20%-wym roztworem wodorotlenku sodu do wartości $\text{pH}=7,0$, wytrącony osad oddziela się na wirówce, wartość pH oczyszczonego płynu obniża się za pomocą 20%-owego roztworu kwasu siarkowego do 3,8 i usuwa się etanol pod zmniejszonym ciśnieniem w niskiej temperaturze. Z otrzymanego koncentratu w ilości 100 litrów oddziela się tłuszcz, a następnie wyodrębnia się insulinę znanym sposobem przez wysolenie i krystalizację soli cynkowej insuliny w buforze cytrynianowym. Otrzymuje się 33,3 g krystalicznej insuliny o aktywności 24 j/mg (wydajność 4000 j/kg trzustki).

Przykład II. Do reaktora /1/ o pojemności 500 litrów, zaopatrzonego w mieszadło łopatkowe, pH-metryczny układ regulujący oraz układ

chłodzenia i ogrzewania, wprowadza się 350 litrów 85%-owego etanolu, zawierającego 4 litry stężonego kwasu fosforowego, i 130 kg wstępnie rozdrobnionej trzustki. Następnie włącza się przepływ otrzymanej mieszaniny przez urządzenie rozdrabniające z szybkością 125 litrów/minutę, kierując wyjściową mieszaninę do reaktora /2/ o pojemności 500 litrów z uruchomionym mieszadłem wolnoobrotowym. W tym samym momencie w reaktorze /1/ włącza się układ regulujący pH mieszaniny w zakresie 3,0—3,5 za pomocą 50%-owego roztworu kwasu fosforowego oraz układ regulujący temperaturę w zakresie $+15$ — $+20^{\circ}\text{C}$ i rozpoczyna się ciągłe dozowanie wstępnie rozdrobnionej trzustki z szybkością 37,5 kg/minutę oraz zakwaszonego alkoholu z szybkością 100 litrów/minutę.

W momencie, gdy w reaktorze /2/ znajduje się 350 ml mieszaniny wyjściowej z urządzenia rozdrabniającego, rozpoczyna się ciągłe dozowanie do niego 20%-owego roztworu wodnego chlorku wapniowego z szybkością 4 litry/minutę (pH mieszaniny spada do wartości 2,5). Za kilka sekund włącza się przepływ zawiesiny z reaktora /2/ przez separujące urządzenie samowyladowcze, oddzielające masę trzustkową wraz z wytrąconym osadem fosforanu wapniowego z szybkością dobraną do szybkości podawania strumienia mieszaniny wyjściowej z urządzenia rozdrabniającego (około 125 litrów/minutę). Ekstrakt po pierwszej ekstrakcji kieruje się do zbiornika /3/ o pojemności 10 000 litrów, zaopatrzonego w mieszadło. Odwirowaną masę trzustkową kieruje się do drugiego analogicznego ciągu ekstrakcyjnego (bez urządzenia rozdrabniającego) w celu wykonania drugiej ekstrakcji.

Ekstrakt po drugiej ekstrakcji także kieruje się do zbiornika /3/. Po otrzymaniu w zbiorniku /3/ 9 000 litrów połączonych ekstraktów nastawia się automatycznie wartość pH na 7,4 za pomocą wody amoniakalnej, a następnie wytrącony osad oddziela się na wirówce. Otrzymany oczyszczony ekstrakt przerabia się w znany sposób.

Przykład III. Do 0,5 litra masy poekstrakcyjnej, otrzymanej sposobem, opisanym w przykładzie I przy zastosowaniu mieszadła tnącego, dodaje się 15 ml 20%-owego wodnego roztworu chlorku barowego. Otrzymaną zawiesinę o wartości $\text{pH}=2,4$ miesza się przez 10 minut i filtruje przez płytę azbestową o powierzchni 100,4 cm^2 na filtrze próżniowym przy ciśnieniu około 50 mm Hg.

Czas filtracji próby wynosi 3,8 minuty. Identyfikatorna próba bez dodatku chlorku barowego, filtrowana w takich samych warunkach, nie jest przesączona po 120 minutach.

Przykład IV. Do 0,5 litra masy poekstrakcyjnej, otrzymanej sposobem, opisanym w przykładzie I przy zastosowaniu mieszadła tnącego, dodaje się 5 g uwodnionego siarczany wapniowego. Otrzymaną zawiesinę miesza się przez 30 minut i filtruje w warunkach, opisanych w przykładzie III. Czas filtracji próby wynosi 5,5 minuty.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania insuliny drogą ekstrakcji rozdrobnionej trzustki zakwaszoną mieszaniną wody i alkoholu etylowego, usunięcia tkanki trzustkowej, wytrącania substancji balastowych i zagęszczania ekstraktu, **znamienny tym**, że rozdrobnioną tkankę trzustkową usuwa się z mieszaniny poekstrakcyjnej w obecności trudno rozpuszczalnych w wodzie soli metali ziem alkalicznych przy wartości $\text{pH}=2,0-4,0$, po czym ekstrakt doprowadza się do wartości $\text{pH}=6,0-7,5$, osad oddziela się, a z oczyszczonego płynu, zawierającego insulinę, usuwa się alkohol etylowy i wyodrębnia insulinę znanymi metodami.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że trudno rozpuszczalne w wodzie sole metali ziem

alkalicznych wytrąca się bezpośrednio w mieszaninie poekstrakcyjnej, zawierającej rozdrobnioną tkankę trzustkową.

3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że jako trudno rozpuszczalne w wodzie sole metali ziem alkalicznych stosuje się fosforany, siarczany i szczawiany metali ziem alkalicznych albo ich mieszaniny.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się trzustkę uprzednio rozdrobnioną w sposób jednorazowy i krótkotrwały w środowisku zakwaszonej mieszaniny wody i alkoholu etylowego przed właściwym procesem ekstrakcji insuliny.

5. Sposób według zastrz. 4, **znamienny tym**, że rozdrabnianie trzustki, ekstrakcję i usuwanie tkanki trzustkowej z mieszaniny poekstrakcyjnej prowadzi się w sposób ciągły.