

ČESKOSLOVENSKÁ  
SOCIALISTICKÁ  
REPUBLIKA  
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

237552

(11) (B1)

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

A 61 K 37/26

/22/ Přihlášeno 14 02 61  
/21/ PV 868-61

(45) Vydáno 15 01 87

(75)

Autor vynálezu

HEDRLÍN LADISLAV, ZBRASLAV, CHROMÍK JINDŘICH, DOLNÍ MĚCHOLUPY,  
ŠAFÁŘ JOSEF, PRAHA

(54) Způsob čištění surového pankreatického ethanolového extraktu,  
obsahujícího inzulin

Vynález se týká způsobu čištění surového pankreatického ethanolového extraktu, obsahujícího inzulin, získaného extrakcí žlázy ethanolom, okyseleným na pH 3,0 až 4,0 minerální kyselinou, výhodně kyselinou fosforečnou.

Vynález se týká způsobu čištění surového pankreatického ethanolového extraktu, obsahujícího inzulin, při pH 3,0 až 4,0, upraveném minerální kyselinou, výhodně kyselinou fosforečnou.

Jak je známo, získává se inzulin extrakcí hovězího, vepřového, popř. telecího pankreatu ethanolom, okyseleným minerální kyselinou, např. chlorovodíkovou, sírovou nebo fosforečnou nebo organickou kyselinou, např. mravenčí nebo octovou.

Kyselý ethanolický extrakt se potom za účelem odstranění bazických bílkovin a jiných balastů upravuje, nejlépe amoniakem, na pH 7,2 až 8,0 a vyloučené balasty se oddělují na kalcium nebo odstředěním.

Získaný čirý filtrát se opět okyseluje na pH 3,2 až 3,5 /kyselinou sírovou/, potom zahuštuje, zbavuje lipidů a dále zpracovává obecně známými postupy na krystalický inzulin.

Je dále známo, že extrakt z 1 kg hovězího nebo vepřového pankreatu obsahuje asi 3 500 až 4 500 m.j. a z 1 kg telecího pankreatu asi 15 000 až 20 000 m.j. inzulinu. Množství inzulinu závisí jak na kvalitě pankreatu, tak na metodě extrakce.

Konečná výtěžnost je přímo ovlivněna použitým technologickým postupem. V průběhu zpracování surového extraktu dosud obvyklým způsobem dochází k poměrně značným ztrátám inzulinu, takže jeho konečný výtěžek je asi 50%, vztaženo na původní množství obsažené v extraktu.

Jednou z hlavních příčin těchto ztrát je již výše zmíněná úprava extraktu do slabě alkalické oblasti /pH 7,2 až 8,0/, která se pokládala /kromě odstranění bazických bílkovin/ za nezbytnou pro usnadnění dalších operací /oddělení lipidních látek, čištění a krystalizace/.

Přitom ovšem je známo, že je inzulin v alkalicko-alkoholickém prostředí labilní. Mimo to jsou takto upravované roztoky surového inzulinu dosti tmavé a jejich odbarvování je nepřijatelné, pracné a zdlouhavé, nehledě ke ztrátám, které toto čištění provádějí.

V britském pat. spise č. 694227 je popsáno použití solí s jednomocnými anionty, s výjimkou solí těžkých kovů, při extrakci žlázy okyseleným vodným alkoholem. Je uveden chlorid sodný, chlorid amonný a vápenatý.

Údajně se tímto opatřením zvyšuje výtěžnost extrakce v prvním vstupní, ovšem úprava do alkalické oblasti /pH 7,6/ a tím i možnost destrukce inzulinu, obsaženého v surovém extraktu, snižují opět počáteční příznivý efekt.

Při prověřování dosud obvyklých postupů se zřetelem k možnostem zvýšení celkové výtěžnosti se podařilo fyzikálně-chemickými metodami prokázat, že při alkalické úpravě extraktu dochází k největší ztrátě, která činí asi 30 % z celkového obsahu inzulinu v extraktu.

Dále bylo zjištěno, že vynecháním alkalické úpravy se znemožňuje oddělování lipidů a velmi znesnadňuje další čištění koncentráту. Na základě těchto poznatků a zkušeností byl vypracován nový zlepšený způsob izolace inzulinu bez alkalické úpravy surového extraktu.

Součástí tohoto postupu je způsob čištění surového pankreatického ethanolového extraktu, obsahujícího inzulin, při pH 3,0 až 4,0, upraveném minerální kyselinou, výhodně kyselinou fosforečnou, a za použití rozpustné soli kovu alkalických zemin, s výhodou chloridu vápenatého, podle vynálezu.

Podstata tohoto způsobu spočívá v tom, že se nejprve připraví surový, kyselý ethanolový extrakt a potom se vyčiří přidávkou rozpustné soli kovu alkalických zemin, s výhodou chloridu vápenatého, při pH 3,0 až 3,5, načež se vyloučená sraženina balastů oddělí, např. odstředěním a ze získaného čirého roztoku se izoluje inzulin.

Nejvýhodnější je přidávat chlorid vápenatý k extraktu v množství 1,5 až 2,5 % hmot., vztaženo na objem surového, pankreatického ethanolového extraktu. Způsobem podle vynálezu se podařilo podstatně snížit dřívější provozní ztráty inzulinu, zjednodušit technologii a z hospodárnit celou výrobu, bez nároků na zvýšenou spotřebu pomocných surovin a na zvláštní zařízení. Celkový výtěžek krystalického inzulinu se tím zvyšuje asi o 20 až 30 %.

#### Příklad 1

500 kg rozemletého vepřového a hovězího pankreatu se extrahuje při teplotě 15 až 20 °C 2 hodiny takovým množstvím ethanolu, aby obsah vody v extraktu byl nejvýše 30 %. K extrakci se používá ethanolu okyseleného kyselinou fosforečnou na pH 3,3 až 3,5.

Po oddělení prvního extraktu se pankreatická drť extrahuje ještě jednou 1 000 litry 70% ethanolu, okyseleného kyselinou fosforečnou na pH 3,3 až 3,5, po dobu 2,5 hodiny. Opět se odstředí a drť se vylisuje.

Ke spojeným extraktům se za míchání přidá roztok 20 kg chloridu vápenatého ve 20 litrech vody. Tím klesne pH extraktu na hodnotu asi 2,5, která se přidavkem zředěného amoniaku 1:1/ upraví opět na 3,2.

Takto upravený extrakt se vyčiří na odstředivce a čirý filtrát se zahustí za sníženého tlaku na 1/10 původního objemu při teplotě nejvýše 35 °C. Před vypuštěním se extrakt v odparce vyhřeje na teplotu 45 °C a po ochlazení se vypustí do sedimentační nádoby, kde se během 2 hodin usadí a oddělí lipidy.

Potom se roztok vyčiří a vysolí přidavkem 25 % /hmot. objem/ chloridu sodného, přičemž se pH udržuje přidavkem HCl na hodnotě 2,0 až 2,5. Vyloučená sraženina se odfiltruje, rozpustí ve 20 litrech vody, roztok se vyčiří a opět vysolí přidavkem 25 % chloridu sodného při pH 2,0 až 2,5.

Takto získaný surový inzulin se dále vyčistí a zpracovává některým ze známých způsobů. Při použití popsaného postupu se získá z 1 kg směsného /vepřového a hovězího/ pankreatu 2 500 až 3 000 m.j. krystalického inzulinu.

#### Příklad 2

Na 500 kg rozemletého pankreatu se přidá extrakt z druhé extrakce /viz příklad 1/ a absolutní ethanol v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace činila 65 %. První extrakce trvá 2 hodiny při teplotě asi 15 °C a při pH 3,3 až 3,5, upraveném kyselinou fosforečnou.

Po skončené extrakci se pankreatická drť oddělí. K extraktu se přidá nasycený roztok chloridu vápenatého a dále se postupuje jako v příkladu 1.

Pankreatická drť po první extrakci se extrahuje podruhé tak, že se k ní přidá extrakt ze třetí extrakce. Extrahuje se 2 hodiny při teplotě 15 až 20 °C, při pH 3,3 až 3,5, upraveném kyselinou fosforečnou.

Po skončené druhé extrakci se pankreatická drť oddělí odstředěním a získaného roztoku se použije opět k první extrakci čerstvého pankreatu. Zbývající drť se podrobí třetí extrakci. Získaného extraktu se používá k druhé extrakci, jak výše popsáno.

Výhodou uvedeného postupu je to, že se při stejných kvalitativních a kvantitativních výsledcích, uvedených v příkladu 1, spotřebuje o 1/3 méně rozpouštědla, čímž se současně zvyšuje o 1/3 kapacita výrobního zařízení.

## PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob čištění surového pankreatického ethanolového extraktu, obsahujícího inzulin, při pH 3,0 až 4,0, upraveném minerální kyselinou, výhodně kyselinou fosforečnou, a za použití rozpustné soli kovu alkalických zemin, s výhodou chloridu vápenatého, vyznačující se tím, že se nejprve připraví surový, kyselý ethanolový extrakt a potom se vyčiří přidavkem rozpustné soli kovu alkalických zemin, s výhodou chloridu vápenatého, při pH 3,0 až 3,5, načež se vyloučená sraženina balastů oddělí, např. odstředěním a ze získaného čirého roztoku se izoluje inzulin.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se chlorid vápenatý přidává k extraktu v množství 1,5 až 2,5 % hmotnostních, vztaženo na objem surového pankreatického ethanolového extraktu.