

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

67736

Patent dodatkowy do patentu

Zgłoszono: 06.IV.1970 (P 139 831)

Pierwszeństwo:

Opublikowano: **16.VII.1973**

Kl. 30h,2/10

MKP A61k 17/04

UKD

Współtwórcy wynalazku: Arnold Adamiec, Janina Grzegorzewska, Mieczysław Łukaszewski, Kazimierz Samuła, Irena Zarebska

Właściciel patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego, Warszawa (Polska)

Sposób wyodrębniania insuliny ze zwierzęcych gruczołów trzustkowych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wyodrębniania insuliny ze zwierzęcych gruczołów trzustkowych.

Znany sposób wyodrębniania insuliny polega na szybkim zamrożeniu świeżo wyjętych z zabitego zwierzęcia gruczołów trzustkowych w temperaturze niższej od 0°C, np. w temperaturze -30°C, a następnie na rozdrobnieniu gruczołów w odpowiednich urządzeniach rozdrabniających i użyciu rozdrobnionych gruczołów bezpośrednio do ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi i dalszego przerobu ekstraktu według ogólnie znanych metod. Sposób ten nie prowadzi do całkowitego wyodrębnienia insuliny i w związku z tym nie stwarza możliwości pełnego wykorzystania tak cennego i deficytowego surowca, jakim są trzustkowe gruczoły zwierzęce.

Stwierdzono, że wydajność wyodrębniania insuliny ze zwierzęcych gruczołów trzustkowych można znacznie zwiększyć stosując według wynalazku przed ekstrakcją rozpuszczalnikami organicznymi poddawanie gruczołów działaniu wodnego roztworu soli metali z II i III grupy układu okresowego. Dodatkowa obróbka gruczołów trzustkowych za pomocą soli tych metali wywiera szczególny wpływ na zawartą w gruczołach insulinę, powodując prawdopodobnie łączenie się cząsteczek insuliny w większe agregaty, co chroni insulinę przed niszczącym działaniem enzymów, a zarazem prowadzi do łatwiejszego wyekstrahowania jej za pomocą rozpuszczalników organicznych.

Według wynalazku świeżo wyjęte z zabitych zwierząt gruczoły trzustkowe poddaje się niezwłocznie działaniu

2

łaniu wodnego roztworu soli w temperaturze $-5^{\circ} + 5^{\circ}\text{C}$ w ciągu 10 minut do 5 godzin, po czym przygotowane w ten sposób gruczoły oddziela się od roztworu soli, oziębia i konserwuje przechowując je w temperaturze $-80^{\circ} + 5^{\circ}\text{C}$. Następnie w dogodnym momencie gruczoły rozdrabnia się, doprowadza do temperatury $-5^{\circ} + 5^{\circ}\text{C}$, pozostawia w tej temperaturze w ciągu 10 minut do 5 godzin, ponownie oziębia się do temperatury $-80^{\circ} + 5^{\circ}\text{C}$ i w znany sposób poddaje się je ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi.

Do sporządzania wodnego roztworu soli używa się soli nieorganicznych i/lub organicznych, w których kationem jest pierwiastek należący do II i/lub III grupy układu okresowego, korzystnie z dodatkiem soli metalu alkalicznego lub amonowej, a w skład anionu wchodzi pierwiastek należący do V—VII grupy układu okresowego lub tworzy go reszta kwasu organicznego zawierającego 1—3 grup karboksylowych w cząsteczce, przy czym kwas ten może być jedno- lub wielofunkcyjny, taki jak aminokwas lub hydroksykwas.

Do sporządzenia roztworu wodnego mogą być użyte różnorodne sole, takie jak np. fosforan potasowy dwuzasadowy, fosforan jednoamoniowy, chlorek potasowy, octan sodowy, glicynian sodowy, cytrynian amoniowy, chlorek wapniowy, mleczan wapniowy, chlorek glinowy, siarczan bismutawy, siarczan glinowo-potasowy, chlorek żelazowy, siarczan żelazawy, cytrynian żelazowy, octan ołowiany, mleczan ołowiany, przy czym skład roztworu może wchodzić zarówno pojedyncza sól metalu należącego do II lub III grupy układu okre-

sowego, jak i mieszanina soli nieorganicznych i/lub organicznych.

Stężenie roztworu może być zawarte w szerokich granicach i wynosi zwykle 1—500 g/l, korzystnie 50—200 g/l. Stosuje się przy tym 0,5—10 objętości roztworu soli, korzystnie 1—3 objętości roztworu soli na 1 objętość gruczołu trzustkowego.

Bezpośrednie traktowanie świeżo wyjętych gruczołów trzustkowych wodnym roztworem soli w praktycznej realizacji może napotykać trudności. W związku z tym może się okazać korzystne zastosowanie odmiany sposobu według wynalazku, polegającej na tym, że świeżo wyjęte z zabitych zwierząt gruczoły trzustkowe najpierw konserwuje się przez oziębienie i przechowuje w temperaturze -80°C — $+5^{\circ}\text{C}$, a następnie w dogodnym momencie gruczoły rozdrabnia się i poddaje działaniu wodnego roztworu soli w temperaturze -5°C — $+5^{\circ}\text{C}$ w ciągu 10 minut do 5 godzin, po czym gruczoły oddziela się od roztworu, oziębia ponownie do temperatury -80°C — $+5^{\circ}\text{C}$ i wreszcie w znany sposób poddaje się ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi.

Wstępna obróbka gruczołu trzustkowego za pomocą wodnego roztworu soli prowadzi do znacznego zwiększenia wydajności wyodrębnienia insuliny przy równoczesnym znacznym zmniejszeniu wahań wydajności w porównaniu ze sposobami znanymi. Tak więc w przypadku zastosowania tego sposobu do wyodrębniania insuliny z wieprzowego gruczołu trzustkowego wydajności sposobu według wynalazku są prawie dwukrotnie wyższe. Przedstawia to poniższa tablica, w której zestawiono wyniki kilku prób wyodrębniania tego hormonu przy zastosowaniu sposobu znanego tj. bez użycia wstępnej obróbki za pomocą wodnego roztworu soli oraz według wynalazku, przy użyciu identycznego surowca i przy niezmiennych pozostałych operacjach wyodrębnienia. Średnia aktywność biologiczna preparatów uzyskanych według obu sposobów była jednako-
wa i wynosiła 24 jedn.m./mg.

Lp próby	Wydajność insuliny przy zastosowaniu sposobu znanego		Wydajność insuliny przy zastosowaniu sposobu wg wynalazku	
	mg/kg świeżej trzustki	jedn. m./kg	mg/kg świeżej trzustki	jedn. m./kg
1.	66,8	1600	132	3200
2.	50,0	1200	125	3000
3.	112,5	2700	158	3800
4.	79,0	1900	134	3200
5.	54,2	1300	128	3050
6.	100,0	1400	146	3500
7.	75,0	1800	137	3300
8.	71,0	1700	131	3150

Przykład I. 2 kg świeżo wyjętych z zabitych zwierząt gruczołów trzustkowych zanurzono w dwukrotnej ilości roztworu zawierającego chlorek wapniowy, alun glinowo-potasowy i octan sodowy w stosun-

ku molowym 0,1 : 2 : 2 w ilości 150 g na 1 l wody i utrzymywano w tym roztworze w ciągu 2 godzin w temperaturze około 0°C . Następnie gruczoły wyjęto z roztworu i szybko zamrożono w temperaturze około -30°C . Zamrożone gruczoły trzustkowe poddano z kolei rozdrobnieniu, doprowadzono temperaturę gruczołów do około 0°C i utrzymywano w tej temperaturze w ciągu 2 godzin. Następnie rozdrobnione gruczoły ponownie szybko zamrożono w temperaturze -30°C .

Dobrze zamrożone gruczoły załadowano do ekstraktora i poddano ekstrakcji przy pomocy 5 l alkoholu etylowego zakwaszonego 120 ml 85% kwasu fosforowego. Ekstrakcję prowadzono 3 godziny. Ekstrakt alkoholowy oddzielono przez wirowanie. Pozostałość ponownie ekstrahowano 70% alkoholem etylowym w ilości 3,5 l i odwirowano. Połączone ekstrakty alkalizowano 15% amoniakiem do wartości $\text{pH} = 7,8 - 8,2$. Wydzielony osad natychmiast odsączono, a ekstrakt zakwaszono 10% kwasem solnym do $\text{pH} 3,5$. Alkohol odparowano na wyparkach w temperaturze nieprzekraczającej 35°C . Wydzielony tłuszcz usunięto przez odsączenie za pomocą celitu. Surową insulinę wysolono z ekstraktu wodnego stosując 20% nasycenia chlorkiem sodowym. Surową insulinę poddawano oczyszczaniu i krystalizacji za pomocą buforu cytrynianowego. Uzyskano 250 mg insuliny o mocy 24 j.m./mg.

Przykład II. 2 kg świeżo wyjętych z zabitych zwierząt gruczołów trzustkowych zamrożono szybko w temperaturze -30°C i przechowywano w tej temperaturze do czasu dalszego przerobu. Następnie gruczoły trzustkowe rozdrobniono na łamaczu szczękowym i doprowadzono temperaturę do około 0°C . Następnie umieszczono je na 2 godziny w dwukrotnej ilości roztworu o temperaturze około 0°C zawierającego: fosforan jednoamonowy, chlorek magnezowy, chlorek potasowy i glicynian sodowy w stosunku molowym 1 : 1 : 2 : 2 w ilości 200 g na 1 l wody. Wreszcie gruczoły trzustkowe wyjęto i szybko zamrożono w temperaturze -30°C .

Dobrze zamrożone gruczoły trzustkowe zmielono i załadowano do ekstraktora. Gruczoły zadano 5 l alkoholu etylowego zakwaszonego 120 ml 85% kwasu fosforowego. Ekstrakcję prowadzono w ciągu 3 godzin. Ekstrakt alkoholowy oddzielono przez wirowanie. Pozostałość ponownie ekstrahowano około 70% alkoholem etylowym w ilości 3,5 l i odwirowano. Połączone ekstrakty alkalizowano 15% amoniakiem do wartości $\text{pH} = 7,8 - 8,2$. Wydzielony osad natychmiast odsączono, a ekstrakt zakwaszono 10% kwasem solnym do wartości $\text{pH} = 3,5$. Alkohol odparowano na wyparkach w temperaturze nieprzekraczającej 35°C . Wydzielony tłuszcz usunięto przez sączenie za pomocą celitu. Surową insulinę wysolono z ekstraktu wodnego stosując 20% nasycenia chlorkiem sodowym. Surową insulinę poddawano oczyszczeniu i krystalizacji za pomocą buforu cytrynianowego. Uzyskano 274 mg insuliny o mocy 24,2 j.m./mg.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wyodrębniania insuliny ze zwierzęcych gruczołów trzustkowych na drodze obróbki surowca w niskiej temperaturze oraz ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi, znamienny tym, że wyjęte z zabitych

zwierząt gruczoły trzustkowe poddaje się niezwłocznie w temperaturze -5° — $+5^{\circ}\text{C}$ w ciągu 10 minut do 5 godzin działaniu wodnego roztworu soli nieorganicznych i (lub organicznych, w których kationem jest pierwiastek należący do II i/lub III grupy układu okresowego, korzystnie z dodatkiem soli metalu alkalicznego lub amonowej, a w skład anionu wchodzi pierwiastek należący do V—VII grupy układu okresowego lub tworzy go reszta kwasu organicznego zawierającego 1—3 grup karboksylowych w cząsteczce, przy czym kwas ten może być jedno- lub wielofunkcyjny, taki jak aminokwas lub hydroksykwas, o stężeniu 1—500 g/l, korzystnie o stężeniu 20—200 g/l, przy czym stosuje się 0,5—10 objętości roztworu soli, korzystnie 1—3 objętości roztworu soli, na 1 objętość gruczołu trzustkowego, po czym gruczoły oddziela się od roztworu soli, oziębia do temperatury -80° —

$+5^{\circ}\text{C}$ i przechowuje w tej temperaturze, a następnie w dogodnym momencie rozdrabnia się je, doprowadza do temperatury -5 — $+5^{\circ}\text{C}$, pozostawia w tej temperaturze w ciągu 10 minut do 5 godzin, po czym ponownie oziębia się je do temperatury -80 — $+5^{\circ}\text{C}$ i w znany sposób poddaje ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi.

2. Odmiana sposobu według zastrz. 1, **znamienna** tym, że świeżo wyjęte z zabitych zwierząt gruczoły trzustkowe niezwłocznie oziębia się i przechowuje w temperaturze -80° — $+5^{\circ}\text{C}$, a następnie rozdrabnia się je i poddaje działaniu wodnego roztworu soli wymienionych w zastrz. 1 w temperaturze -5° — $+5^{\circ}\text{C}$ w ciągu 10 minut do 5 godzin, po czym gruczoły oddziela się od roztworu, oziębia ponownie do temperatury -80° — $+5^{\circ}\text{C}$ i w znany sposób poddaje ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi.