



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 245 126 A5

4(51) A 61 K 31/725
C 08 B 37/10

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP A 61 K / 290 767 7
(31) 2197/85(22) 30.05.86
(32) 04.06.85(44) 29.04.87
(33) HU

(71) siehe (73)

(72) Kerey, György, Dr. Dipl.-Chem.; Illés, János, Dipl.-Chem.; Stefkó, Béla, Dr. Dipl.-Chem.; Neszmélyi, Erzsébet, Dipl.-Chem.; Gere, Pál, Dipl.-Chem.; Zámbo, István, Dipl.-Chem., HU

(73) Richter Gedeon Vegyészeti Gyár RT, Budapest X, Gyömrői ut 19–21, HU

(54) Verfahren zur Herstellung von Heparinsalzen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von reinen Heparinaten, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a) eine wäßrige Lösung eines quaternären Ammoniumhalogenids, das mit dem Heparin einen quaternären Ammonium-Komplex bildet, zu einer wäßrigen Lösung eines gegebenenfalls Schwermetallsalz und unwirksame Heparinoid-Fractionen enthaltenden Heparinates gibt;
- b) den ausgeschiedenen Komplex von Heparin mit dem quaternären Amin abtrennt und mit ionen- und pyrogenfreiem Wasser reinigt;
- c) den gereinigten Komplex von Heparin mit dem quaternären Amin beispielsweise in der wäßrigen Lösung des Salzes, das dem Kation des herzustellenden Heparinates entspricht, löst; oder in einem mit Wasser mischbaren, organischen Lösungsmittel auflöst, und dann eine wäßrige Lösung eines Salzes, welches dem Kation des herzustellenden Heparinates entspricht, dieser Lösung zugibt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von den medizinischen Vorschriften entsprechenden Heparinaten, vor allem von Calciumheparinat, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
 - a) eine wäßrige Lösung eines quaternären Ammoniumhalogenids, das mit dem Heparin einen quaternären Ammonium-Komplex bildet, zu einer wäßrigen Lösung eines den medizinischen Vorschriften entsprechenden oder pyrogenfreien, gegebenenfalls Schwermetallsalz und unwirksamen Heparinoid-Fraktion enthaltenden Heparinates gibt;
 - b) den ausgeschiedenen Komplex von Heparin und quaternärem Amin abgetrennt und mit ionen- und pyrogenfreiem Wasser reinigt;
 - c) den gereinigten Komplex des Heparins mit dem quaternären Amin
 - i) in der wäßrigen Lösung des Salzes, das dem Kation des herzustellenden Heparinates entspricht, löst, oder
 - ii) in einem mit Wasser mischbaren, organischen Lösungsmittel auflöst und dann eine wäßrige Lösung eines Salzes, das dem Kation des herzustellenden Heparinats entspricht, dieser Lösung zugibt; oder
 - iii) in einem mit Wasser unmischbaren oder nur begrenzt mischbaren, organischen Lösungsmittel löst, und dann eine wäßrige Lösung eines Salzes, das dem Kation des herzustellenden Heparinates entspricht, dieser Lösung zugibt, beide Phasen sich voneinander trennen läßt und dann endgültig trennt; und gewünschtenfalls eine wäßrige Lösung eines weiteren Salzes, das dem Kation des herzustellenden Heparinats entspricht, zu der im Schritt iii) erhaltenen organischen Phase gibt, beide Phasen sich voneinander trennen läßt, dann endgültig trennt, und die wäßrigen Phasen vereinigt, gewünschtenfalls die Lösung reinigt und das entstandene Heparinat durch Zugabe eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels ausfällt und zuletzt das ausgefällte Heparinat in bekannter Weise gewinnt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
 - a) eine 1 bis 20 Gew./Vol.%ige, vorzugsweise 5 bis 15 Gew./Vol.%ige wäßrige Lösung eines quaternären Ammoniumhalogenids, das den Komplex aus Heparin und quaternärem Amin bildet, in einer Menge von 1,5 bis 3,5 g/10⁵ IE von Heparin zu einer wäßrigen Lösung, eines eine Konzentration von 500 bis 10000 IE/ml, bevorzugt von 100 bis 5000 IE/ml aufweisenden den medizinischen Vorschriften entsprechenden oder pyrogenfreien, gegebenenfalls Schwermetallsalz und unwirksamen Heparinoid-Fractionen enthaltenden Heparinates gibt;
 - b) den ausgeschiedenen Komplex von Heparin und quaternärem Amin abtrennt und mit ionen- und pyrogenfreiem Wasser reinigt;
 - c) den gereinigten, zentrifugennassen Komplex von Heparin und quaternärem Amin
 - i) in einer wäßrigen Lösung eines in Konzentration von 1,5 bis 2,5 Mol aufweisenden Salzes, das dem Kation des herzustellenden Heparinats entspricht, löst;
 - oder
 - ii) in einer 4- bis 10fachen Menge, vorzugsweise in einer 6- bis 8-fachen Mengen eines mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittels auflöst, und dann eine wäßrige Lösung von 0,3 bis 1,0 Mol eines Salzes, das dem Kation des herzustellenden Heparinats entspricht, dieser Lösung zugibt; oder
 - iii) in einer 4- bis 10fachen Menge, vorzugsweise in einer 6- bis 8fachen Menge eines mit Wasser unmischbaren oder begrenzt mischbaren organischen Lösungsmittel auflöst und dann eine wäßrige, eine Konzentration von 0,3 bis 1,0 Mol aufweisende Lösung eines Salzes, das dem Kation des herzustellenden Heparinats entspricht, dieser Lösung zugibt, beide Phasen sich voneinander trennen läßt und dann endgültig trennt; und gewünschtenfalls eine wäßrige eine Konzentration von 0,3 bis 1,0 Mol aufweisende Lösung eines weiteren Salzes, das dem Kation des herzustellenden Heparinats entspricht, zu der im Schritt iii) erhaltenen organischen Phase gibt, beide Phasen sich voneinander trennen läßt und dann endgültig trennt und abschließend die wäßrigen Phasen vereinigt, gewünschtenfalls die Lösung reinigt und das entstandene Heparinat durch Zugabe eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels ausfällt und zuletzt das ausgefällte Heparinat in bekannter Weise gewinnt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) oder (II), worin

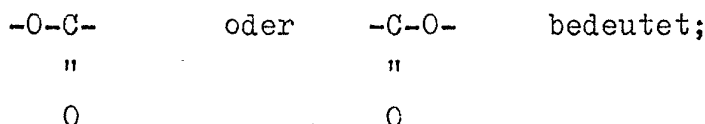
R für eine geradkettige oder verzweigte C₈₋₁₈ Alkylgruppe, eine Phenyl- oder eine Phenyl-(C₁₋₃Alkyl)-Gruppe steht;

R₁, R₂ und R₃ gleich oder verschieden sind und eine geradkettige oder verzweigte C₁₋₄ Alkylgruppe bedeuten;

oder

R_n für Wasserstoff oder eine Gruppe steht, dessen Bedeutung die gleiche wie die von R ist;

A eine Gruppierung der Formel



- B und D gleich oder verschieden sind und für eine Valenzbindung oder für eine Gruppierung, deren Bedeutung mit der von A identisch ist, stehen;
- N[⊕] ein quaternäres Stickstoffatom bedeutet;
- X[⊖] für ein einwertiges anorganisches Anion steht;
- m 1, 2, 3 oder 4 bedeutet;
- n 0, 1, 2, 3 oder 4 bedeutet;
- k 1, 2 oder 3 bedeutet;
- als quaternäres Ammoniumhalogenid verwendet.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als quaternäres Ammoniumhalogenid Carbotetradecyl-oxymethyl-trimethyl-ammoniumchlorid in einer dem Inflexionspunkt der potentiometrischen Titrierungskurve entsprechenden Menge, in einer Menge von 1,0 bis 2,0 g/10⁵ IE von Heparin verwendet.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man Benzyl-dimethyl-(2-[2-(p-1,1,3,3-tetramethyl-butyl-phenoxy)-ethoxy]-ethyl)-ammonium-chlorid (Hyamin[®] 1622) in einer dem Inflexionspunkt der potentiometrischen Titrierungskurve entsprechenden Menge, in einer Menge von 1,0 bis 2,0 g/10⁵ IE von Heparin als quaternäres Ammoniumhalogenid verwendet.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Cetyl-pyridinium-chlorid oder Cetyl-trimethyl-ammonium-bromid in einer dem Inflexionspunkt der potentiometrischen Titrierungskurve entsprechenden Menge, in einer Menge von 1,0 bis 2,0 g/10⁵ IE von Heparin als quaternäres Ammoniumhalogenid verwendet.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß der gereinigte zentrifugennasse Komplex von Heparin und quaternärem Amin in 20 bis 50 ml einer wäßrigen Calciumchlorid-Lösung mit einer Konzentration von 1,5 bis 2,5 Mol, berechnet für 10⁵ IE von Heparin, gelöst wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß der gereinigte, zentrifugennasse Komplex des Heparins mit dem quaternären Amin in einer 4- bis 10fachen, vorzugsweise in einer 6- bis 8fachen Menge eines mit Wasser begrenzt mischbaren organischen Lösungsmittels, zweckmäßig in Isopropanol oder n-Butanol gelöst wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß der gereinigte, zentrifugennasse Komplex von Heparin und quaternärem Amin in einer 4- bis 10fachen, vorzugsweise in einer 6- bis 8fachen Menge eines mit Wasser unmischar organischen Lösungsmittels, vorzugsweise in Chloroform, gelöst wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß der gereinigte, zentrifugennasse Komplex von Heparin und quaternärem Amin in einer 4- bis 10fachen, vorzugsweise in einer 6- bis 8fachen Menge von n-Butanol gelöst wird, woraufhin für die Lösung berechnet in 20 bis 50, vorzugsweise in 30 bis 40 Ma.-%, wäßriger Calciumchlorid-Lösung mit einer Konzentration von 0,3 bis 0,5 Mol gelöst wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß das entstandene Heparinsalz aus der Lösung mittels eines mit Wasser unbegrenzt mischbaren organischen Lösungsmittels, vorzugsweise mittels eines Alkohols oder Alkanons, ausgefällt wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß das entstandene Heparinsalz durch Zugabe von Methanol, Ethanol oder Aceton ausgefällt wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Menge des zur Bildung des Komplexes aus Heparin und quaternärem Amin erforderlichen quaternären Ammoniumhalogenids durch potentiometrische Titrierung bestimmt wird.

Hierzu 1 Formelblatt u. 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von Heparinsalzen, die den medizinischen Vorschriften entsprechen. In dieser Patentanmeldung sind unter dem Ausdruck „den medizinischen Vorschriften entsprechenden Heparinsalze“ Heparinsalze mit einer solchen Reinheit zu verstehen, die den Qualitätsvorschriften der USP XXI (The United States Pharmacopoea XXI) entsprechen.

„Heparinsalze“ („Heparinate“) bedeuten die therapeutisch verwendbaren Salze, z. B. das Magnesium-, Kalium-, Lithium- und Ammoniumsalz, insbesondere aber das Calciumsalz (-Heparinat). In der Beschreibung sind also „Heparinsalz“ und „Heparinat“ synonyme Ausdrücke (Heparin-Natriumsalz ist also mit Natriumheparinat identisch).

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Verwendung des im Jahr 1913 entdeckten Heparins ist in der klinischen Therapie und Prophylaxe weit verbreitet. Das seit Jahrzehnten in industriellem Maßstab hergestellte, therapeutisch reine Heparin wurde fast ausschließlich in der Form des Natriumsalzes verwendet. Bis zu den letzten Jahren befaßten sich die medizinischen Vorschriften nur mit den Qualitätskriterien des Natriumheparinates. Die jahrzehntelangen Erfahrungen, die bei der Verwendung von Natriumheparinat gewonnen wurden, sowie die Ergebnisse der in den letzten Jahren durchgeführten klinischen Untersuchungen sprechen aber dafür, daß die Heparinsalze, die ein von dem Natriumkation abweichendes Kation enthalten, auf einigen Anwendungsgebieten vorteilhaftere Eigenschaften verfügen. Calciumheparinat hat z. B. eine längere Wirkungsdauer als Natriumheparinat, wodurch ein Beibehalten der therapeutischen Dosis bei Patienten, die mit Heparin behandelt werden bei weniger häufigen Verabreichungen der Dosis möglich ist, wobei die bei dem Natriumheparinat auftretenden Suffusionen durch die Verabreichung des Heparins in der Form seines Calciumsalzes vermieden werden können (Kakkar, V. V.: Clinical Usage of Heparin. Present and Future Trends, Edit. M. Verstraete, S. J. Machin; Munsgaard, Kopenhagen 1980, Seite 158; Kakkar V. V. Heparin Chemistry and Chemical Usage, Academic Press 1976).

Für klinische und diagnostische Zwecke beschäftigt sich deshalb die Herstellerindustrie zunehmend mit der Herstellung von Heparinaten, die anstelle des Natriumkations ein anderes Kation enthalten. (Solche Heparinate sind z. B. das Calcium-, Magnesium-, Lithium-, Kalium- oder Ammoniumheparinat.)

Bei den bisher bekannten Verfahren wurde das Problem des Austausches des Natriumkations des Heparins dadurch gelöst, daß die wäßrige Lösung des Natriumheparinats mit einem wasserlöslichen Salz des zum Einsatz kommenden anderen Metallkations unmittelbar in Berührung gebracht wurde (nachfolgend wird dieses Verfahren als „reversibel“ bezeichnet), oder dadurch, daß das Heparin durch den Einsatz eines sauren Ionenaustauschharzes in Form der freien Säure isoliert wurde, woraufhin das gewünschte Salz gebildet wurde (nachfolgend wird dieses Verfahren als „irreversibel“ bezeichnet).

Bei dem „reversiblen“ Verfahren kann der Austausch des Natriumkations bis zur Erreichung eines Natriumkationen-Gehaltes von 1 Ma.-% in einem Schritt auch dann nicht ermöglicht werden, wenn das Salz des zum Einsatz kommenden anderen Kations in einem großen Überschuß vorhanden ist, da das Gleichgewicht des reversiblen Prozesses durch eine Steigerung der Konzentration des neuen Kations in Richtung der Bildung des neuen Heparinsalzes nur geringfügig verschoben werden kann. Zur weiteren Verschiebung des Gleichgewichts sind eine Isolierung durch Ausfällung mit einem Lösungsmittel des noch Natriumkationen enthaltenden „gemischten“ Heparinsalzes und eine mehrmalige Wiederholung dieses Prozesses erforderlich. Es ist klar, daß diese mehrstufige Umwandlung einen erheblichen Aufwand an Zeit, Arbeitskraft und Lösungsmittel erfordert, wobei die Ausbeute infolge der großen Anzahl der Verfahrensschritte stark verringert wird.

Bei dem „irreversiblen“ Verfahren wird der Kationenaustausch mittels eines sauren Kationenaustauschers durchgeführt. Im ersten Schritt dieses Verfahrens wird das Heparin in Form der instabilen freien Säure gebildet, wodurch die Wirksamkeit des antikoagulant Stoffes um etwa 20 bis 30% vermindert wird.

Man hat bereits versucht, die Nachteile des „reversiblen“ Verfahrens zu beseitigen (DE-PS 2417859). Hierbei sollte der Kationenaustausch ohne den Einsatz eines ionenaustauschenden Harzes durch eine Abwandlung des „reversiblen“ Verfahrens ermöglicht werden, indem die Verschiebung des Gleichgewichtes nicht nur durch die Isolierung des gebildeten gemischten Heparinsalzes, sondern zusätzlich noch durch die Entfernung des Kations des Ausgangs-Natriumheparinates durch Dialyse verbessert, also erhöht wurde. Dieses Verfahren wird z. B. zur Herstellung von Calciumheparinat aus einem Natriumheparinat mit in medizinischer Hinsicht einwandfreier Qualität wie folgt durchgeführt:

Einer wäßrigen Lösung von Natriumheparinat fügt man Calciumchlorid in kleinen Portionen zu, dann rührt man das Gemisch 16 Stunden lang, woraufhin die Lösung 6 Stunden lang in einer kleinen Menge (300 ml) gegen ionen- und pyrogenfreies Wasser dialysiert wird, um die in dem Reaktionsgemisch anwesenden Natriumionen zu entfernen. Aus der dialysierten, etwa um das Doppelte verdünnten Lösung fällt man das „gemischte“ Heparinsalz, also das Gemisch aus Calcium- und Natriumheparinat, mittels eines organischen Lösungsmittels aus. Die so isolierte Substanz wird in destilliertem Wasser gelöst, und dann wird die gesamte Operation wiederholt. Der Gehalt des isolierten Calciumheparinates an Natriumionen liegt unter 0,1 Vol.-%, seine spezifische Aktivität ist mit dem Ausgangsstoff nahezu identisch.

Ein zweifelloser Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß der mehrstufige Kationenaustausch durch die Anwendung der Dialyse in einer nur zweistufigen Operation durchgeführt werden kann. Die Dialyse bringt jedoch zahlreiche Nachteile mit sich: Die Dauer der Verfahrensschritte wird erheblich verlängert, die Gefahr der Pyrogenität und der Infektion werden gesteigert; die Vorbereitung der Dialysierhülsen und die in kleinen Volumina ausgeführten Dialysooperationen sind arbeitsintensiv, wodurch die Anzahl der Verlustquellen gesteigert wird. Durch die Anwendung dieses Verfahrens kann die Reinigung von Heparin, beziehungsweise die Erhöhung seiner spezifischen Wirksamkeit nicht erreicht werden, da ja bereits der Ausgangsstoff ein Natriumheparinat hoher Reinheit sein muß.

Mit den bekannten Verfahren wird daher der Austausch des Heparinat-Kations durch die Verwendung eines kationenaustauschenden Harzes in einem „irreversiblen“ Verfahren oder durch mehrere aufeinander folgende Gleichgewichtsschritte erreicht, wobei im zweiten Fall das Gleichgewicht der einzelnen Schritte durch Abscheidung des „gemischten“ Heparinsalzes fixiert wird und der Gleichgewichtszustand, ausgehend von diesem Zustand, mittels eines neuen reversiblen Prozesses in dem gewünschten Ausmaß verschoben wird.

Ziel der Erfindung

Mit der Erfindung sollen die Mängel des Standes der Technik beseitigt werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem der Austausch des Heparinkations ohne Bildung der zersetzlichen Heparinsäure durch Herstellung eines wasserunlöslichen Zwischenproduktes „irreversibel“ gemacht wird und der Kationenaustausch aus dem gebildeten Zwischenprodukt in einem Schritt quantitativ ausgeführt werden kann. Hierdurch soll der Kationenaustausch nicht nur aus einem Heparinat von medizinisch einwandfreier Qualität, sondern auch aus irgendeiner wäßrigen Lösung die dem pyrogenbefreienden Schritt der Heparinproduktion folgt, ermöglicht werden. Auch soll das Verfahren die Möglichkeit bieten, das Heparin weiter zu reinigen und seine spezifische Wirksamkeit zu erhöhen.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß die quaternären Ammoniumkationen der quaternären Ammoniumhalogenide, die bei der Heparinproduktion für andere Zwecke verwendet werden, unter entsprechenden Bedingungen zum Austausch der Heparinat-Kationen geeignet sind, und daß der Prozeß wegen des wasserunlöslichen Charakters des Komplexes des Heparins mit dem quaternären Amin irreversibel ist, wodurch der Kationenaustausch quantitativ gemacht werden kann. Aus dem gebildeten Komplex von Heparin mit dem quaternären Amin kann man das gewünschte Kationensalz des Heparins durch einen irreversiblen Kationenaustausch unter Bedingungen, die später beschrieben werden, derart herstellen, daß das so gewonnene Heparinat praktisch nur das gewünschte Kation enthält.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird demzufolge der Kationenaustausch in zwei aufeinanderfolgenden irreversiblen Schritten erreicht.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein neues Verfahren zur Herstellung von den medizinischen Vorschriften entsprechenden Heparinaten, vor allem von Calciumheparinat, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- eine wäßrige Lösung eines quaternären Ammoniumhalogenids, das mit dem Heparin einen quaternären Ammonium-Komplex bildet zu einer wäßrigen Lösung eines den medizinischen Vorschriften entsprechenden oder pyrogenfreien, gegebenenfalls Schwermetallsalz und unwirksame Heparinoid-Fractionen enthaltenden Heparinates ergibt;
- den ausgeschiedenen Komplex von Heparin und quaternärem Amin abtrennt und mit ionen- und pyrogenfreiem Wasser reinigt;
- den gereinigten Komplex des Heparins mit dem quaternären Amin

- i) in der wäßrigen Lösung des Salzes, das dem Kation des herzustellenden Heparinates entspricht, löst; oder
- iii) in einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel auflöst und dann eine wäßrige Lösung eines Salzes, das dem Kation des herzustellenden Heparinats entspricht, dieser Lösung zugibt; oder
- III) in einem mit Wasser unmischbaren oder nur begrenzt mischbaren, organischen Lösungsmittel löst, und dann eine wäßrige Lösung eines Salzes, das dem Kation des herzustellenden Heparinats entspricht, dieser Lösung zugibt, beide Phasen sich voneinander trennen läßt und dann endgültig trennt;
und gewünschtenfalls eine wäßrige Lösung eines weiteren Salzes, welches dem Kation des herzustellenden Heparinats entspricht, zu der im Schritt iii) erhaltenen organischen Phase gibt, beiden Phasen sich trennen läßt, dann endgültig trennt, und die wäßrigen Phasen vereinigt,
gewünschtenfalls die Lösung reinigt und das entstandene Heparinat durch Zugabe eines mit Wasser mischbaren Lösungsmittels ausfällt und zuletzt das ausgefallte Heparinat in bekannter Weise gewinnt.

Im ersten Schritt des Verfahrens wird eine wäßrige Lösung eines quaternären Ammoniumhalogenids, das in dem wäßrigen Medium gut dissoziiert und dessen quaternäres Ammonium-Kation mit dem Heparinat-Anion einen wasserunlöslichen Komplex bildet, der pyrogenfreien wäßrigen Lösung des Heparinats zugegeben, die in Abhängigkeit von den vorherigen technologischen Schritten normalerweise Natrium-Kationen, aber auch andere Kationen und Anionen außerhalb des Heparinat-Anions enthalten kann.

Der oben geschilderte Prozeß kann durch die folgende, vereinfachte Reaktionsgleichung beschrieben werden:



In dieser Gleichung bedeuten:

- $[\text{Hep}^{n-}]$: das Heparinat-Anion;
- $[\text{K}_1^+]$: das ursprüngliche Kation des Heparins (gewöhnlich Natriumion);
- $[\text{K}_2^+]$: ein quaternäres Amin-Kation, das mit dem Heparinat-Anion ein wasserunlösliches Salz bildet;
- $[\text{A}^-]$: ein Halogenidion (normalerweise ein Chlorid- oder Bromidion);
und
- n: die Anzahl der negativen Ladungen des Heparinat-Anions.

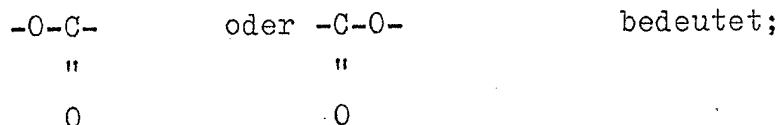
Da der Komplex von Heparin und quaternärem Amin wasserunlöslich ist, läuft die Reaktion in Pfeilrichtung quantitativ ab. Die in dem Medium eventuell anwesenden anderen Kationen und Anionen beeinflussen den Ablauf des Prozesses nicht. Der ausgeschiedene Komplex aus Heparin und quaternärem Amin wird abgetrennt und mit ionen- und pyrogenfreiem Wasser gereinigt.

Im Gegensatz zu den langsamen Gleichgewichtsprozessen läuft der oben geschilderte Ionenaustausch sehr kurzfristig ab. Die Entfernung der anderen Kationen kann anstelle der langwierigen und schwierigen Dialyse durch einfache Trenn- und Waschprozesse erfolgen.

Von den mit dem Heparinat einen wasserunlöslichen Komplex bildenden Salzen wurden solche quaternäre Ammoniumhalogenide als besonders geeignet befunden, die während der Heparinproduktion auch für andere Zwecke (zur Abscheidung von Heparin aus verdünnten, wäßrigen, heparinhaltigen Lösungen der tierischen Organe und Gewebe sowie zur Isolierung des rohen Heparins) geeignet sind. Solche quaternäre Ammoniumhalogenide sind z. B. Cetyl-piridinium-chlorid, Cetyl-trimethyl-ammonium-bromid, Hyamin[®] 1622 (chemisch: Benzyl-dimethyl-{2-[2-(p-1,1,3,3-tetramethyl-butyl-phenoxy)-ethoxy]-ethyl}-ammonium-chlorid) und deren Derivate (US-PS 2989438, 3058884, 3160563 und 3342683 sowie die in den HU-PS 188537 beschriebenen weiteren quaternären Ammoniumhalogenide, z. B. das Carbotetradecyloxymethyl-trimethyl-ammonium-chlorid und verwandte Verbindungen).

Vorzugsweise wird ein quaternäres Ammoniumhalogenid der allgemeinen Formel (I) oder (II) verwendet, worin

- R für eine geradkettige oder verzweigte C₈₋₁₈ Alkylgruppe, eine Phenyl- oder Phenyl-(C₁₋₃-Alkyl)-Gruppe steht;
- R₁, R₂ und R₃ gleich oder verschieden sind und eine geradkettige oder verzweigte C₁₋₄ Alkylgruppe bedeuten; oder
- R₁ und R₂ zusammen eine Pentamethylen-Gruppe bedeuten, wobei R₃ für Wasserstoff steht;
- R_n für Wasserstoff oder eine Gruppe steht, deren Bedeutung mit der von R übereinstimmt;
- A eine Gruppierung der Formel



- B und D gleich oder verschieden sind und für eine Valenzbindung oder für eine Gruppierung, dessen Bedeutung mit der von A identisch ist, stehen;
- N[⊕] ein quaternäres Stickstoffatom bedeutet;
- X[⊖] für ein einwertiges anorganisches Anion steht;
- m 1, 2, 3 oder 4 bedeutet;
- n 0, 1, 2, 3 oder 4 bedeutet;
- k 1, 2 oder 3 bedeutet.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung von quaternären Ammoniumhalogeniden besteht darin, daß die meisten auch eine bakterizide Wirkung aufweisen, wodurch — im Vergleich mit anderen Herstellungstechnologien von Calciumheparinat — die Gefahr der Rückinfektion und die hieraus resultierende Pyrogenität auf ein Minimum verringert werden.

Weiter wurde erkannt, daß die Abscheidung des Heparin-Komplexes mit dem quaternären Amin leicht automatisch kontrollierbar ist, wodurch es möglich wird, die spezifische Wirksamkeit des Heparins beim Ionenaustausch zu steigern. Durch Messen des Elektrodenpotentials der wäßrigen Heparin-Lösung mit einer beliebigen kombinierten Glaselektrode kann der Prozeß der Ausfällung potentiometrisch verfolgt und die Menge der wäßrigen Lösung des quaternären Ammoniumhalogenids optimal eingestellt werden. Es scheiden sich nämlich die Fraktionen mit einer hohen antikoagulanten Wirksamkeit bei Beginn und die unwirksamen Fraktionen am Ende der Zugabe der wäßrigen Lösung des quaternären Ammoniumhalogenids aus einem zahlreiche Fraktionen enthaltenden Heparinmischgemisch ab. Durch Verfolgung der potentiometrischen Kurve kann das optimale Verhältnis festgesetzt werden, bei dem die unwirksamen Fraktionen nach dem Abstellen des Prozesses nicht in den Niederschlag gelangen. Dadurch kann eine Steigerung der Wirksamkeit um 10 bis 15% erreicht werden, wenn man von Natriumheparinat mit einwandfreier Qualität ausgeht.

Aus den Komplexen des Heparins mit einem quaternären Amin kann ein beliebiges Salz des Heparins durch einen weiteren irreversiblen Kationenaustausch in einfacher Weise hergestellt werden. Es ist nämlich bekannt, daß die Komplexe des Heparins mit einem quaternären Amin mit wäßrigen Salzlösungen, z. B. mit einer Natriumchlorid-Lösung, deren Konzentration höher als 2M ist, in Lösung gebracht werden können, und daß das Natriumheparinat aus dieser Lösung durch Ausfällen mit einem Lösungsmittel isoliert werden kann, da sich die quaternären Ammoniumhalogenide in den zur Ausfällung verwendeten organischen Lösungsmitteln lösen. Infolge der Ausscheidung der Heparinate verläuft auch der Ionenaustausch irreversibel. Bisher wurde dieses Verfahren ausschließlich zur Isolierung eines rohen Natriumheparinates aus Natriumheparinat enthaltenden Lösungen angewendet. Nunmehr wurde erkannt, daß dieses Verfahren nicht nur zur Herstellung von rohem Heparin und nicht nur im Fall des Natrium-Kations, sondern auch zur Herstellung eines Heparinsalzes, das den medizinischen Vorschriften entspricht, und mit einem beliebigen Kation anwendbar ist, wodurch der Ionenaustausch mit einem günstigen Wirkungsgrad durchgeführt werden kann. Bei den Versuchen wurde festgestellt, daß diese Methode tatsächlich so variiert werden kann, daß sie zur Herstellung von Heparinsalzen der obigen Qualität geeignet ist, wobei jedoch jene Nachteile beseitigt werden, die keine Probleme bei der Herstellung eines rohen Natriumheparinates darstellen, da die Qualitätsanforderungen verschieden sind. So ist es z. B. erforderlich, das abgeschiedene Heparinsalz wegen der hohen Salzkonzentrationen im Wasser wieder zu lösen und mit einem Lösungsmittel auszufällen, um den gewünschten Aschengehalt zu erreichen. Ferner muß ein gründliches Waschen mit einem Lösungsmittel erfolgen, um die quaternäre Ammoniumverbindung völlig zu entfernen.

Wegen der obigen Nachteile wurde eine günstigere Ausführungsform gesucht und es wurde gefunden, daß wenn der Komplex des Heparins mit dem quaternären Amin in erstem Schritt nicht in einer wäßrigen Lösung mit hoher Salzkonzentration, sondern in einem organischen Lösungsmittel durchgeführt wird, wie dies bei der Ausfällung des Heparins normalerweise erfolgt (z. B. Methanol, Ethanol, Aceton), der Ionenaustausch des in Lösung gebrachten Komplexes des Heparins mit dem quaternären Amin durch Zugabe einer wäßrigen Lösung von bedeutend geringeren Konzentrationen durchgeführt werden kann, wobei das gewünschte Heparinsalz durch Einstellen des Lösungsmittelverhältnisses mit einem geeigneten Aschengehalt praktisch frei von anorganischen Salzen abgeschieden werden kann. Es ist aber auch hier erforderlich, mit einem Lösungsmittel gründlich zu waschen, um das quaternäre Ammoniumhalogenid zu entfernen.

Als günstigste Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens hat es sich herausgestellt, den Komplex des Heparins mit dem quaternären Ammoniumhalogenid im ersten Schritt in einem mit Wasser unmischbaren oder nur begrenzt mischbaren organischen Lösungsmittel (z. B. in Isopropanol, n-Butanol, Chloroform) zu lösen, dann den Ionenaustausch durch die portionsweise Zugabe der wäßrigen Lösung des das gewünschte Kation enthaltenden Salzes durchzuführen und zuletzt das Salz des Heparins nach Trennung der Phasen aus der wäßrigen Phase durch die portionsweise Zugabe eines organischen Lösungsmittels (z. B. Aceton, Ethanol, Methanol) abzuscheiden. Hierbei wird die Irreversibilität des Ionenaustausches durch die Anwesenheit der unmischbaren Flüssigkeitsphasen gesichert. Es bleibt nämlich das quaternäre Ammoniumhalogenid in der organischen Phase, während das Heparin in die wäßrige Phase in Form seines mit dem neuen Kation gebildeten Salzes gelangt. Ein weiterer Vorteil dieser Ausführungsform besteht darin, daß die Entfernung der quaternären Ammoniumverbindung in dieser Weise während der Trennung der Phasen erfolgt.

Zur wäßrigen Lösung eines Natriumheparinates von einer den medizinischen Vorschriften entsprechenden Qualität oder eines von Pyrogenen befreiten Natriumheparinates, das gegebenenfalls Schwermetallsalz und unwirksame Heparinoid-Fractionen enthält dessen Heparinkonzentration 500 bis 10 000 IE/ml, zweckmäßig 1 000 bis 5 000 IE/ml beträgt und dessen pH-Wert 2 bis 10, zweckmäßig 4 bis 8 beträgt, wird eine wäßrige Lösung einer quaternären Ammoniumverbindung, zweckmäßig von Hyamin® 1622 oder Carbotetradecyl-oxymethyl-trimethyl-ammonium-chlorid von 1 bis 20 Ges./Vol.-%, zweckmäßig von 5 bis 15 Gew./Vol.-%, portionsweise unter Rühren zugegeben. Die Menge des zugegebenen quaternären Ammoniumsalzes beträgt 1,5 bis 3,5 g/10⁵ IE von Heparin. Wenn auch eine Steigerung der spezifischen Wirksamkeit angestrebt wird, führt man die Bestimmung des optimalen Verhältnisses zweckmäßig wie folgt durch:

Ein genau abgewogenes Aliquot der auszufällenden wäßrigen Natriumheparinat-Lösung wird entnommen, und unter Rühren und Messen des Elektrodenpotentials mittels einer kombinierten Glaselektrode wird eine wäßrige Lösung von 10 Gew./Vol.-% des ausgewählten quaternären Ammoniumsalzes portionsweise zugegeben. Der in mV gemessene Elektrodenpotentialwert wird in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge graphisch dargestellt, und aufgrund der aufgenommenen potentiometrischen Kurve wird die Menge des zur Abscheidung der wirksamen Heparinfraktion benötigten quaternären Ammoniumsalzes berechnet. Zur Feststellung des optimalen Verhältnisses ist es deshalb nicht erforderlich, die Heparinkonzentration der wäßrigen Heparinlösung zu kennen, da das Verhältnis der Reagenzien durch das Verhältnis „Menge in ml der bei der Titrierung verbrauchten quaternären Ammoniumlösung/ml der Heparinlösung“ ausgedrückt werden kann.

Nach Abscheidung des quaternären Ammoniumsalzes des Heparins wird die Mutterlauge durch Zentrifugieren entfernt. Der zentrifugierte Niederschlag wird in einem ionen- und pyrogenfreien Wasser suspendiert und erneut zentrifugiert.

Der so gewonnene Niederschlag wird in einem 4- bis 10fachen, zweckmäßig in einem 6- bis 8fachen Volumen eines organischen Lösungsmittels, zweckmäßig eines mit Wasser unmischbaren oder nur begrenzt mischbaren Lösungsmittels — z. B. in Chloroform, Isopropanol, Ethylacetat, am vorteilhaftesten in n-Butanol — gelöst. Nach der Auflösung wird eine Lösung von 1 bis 10 Gew./Vol.-%, vorzugsweise von 2 bis 5 Gew./Vol.-% eines das gewünschte Kation enthaltenden, wasserlöslichen Salzes,

zweckmäßig eines chloridhaltigen Salzes, bevorzugt zur butanolischen Lösung des quaternären Ammoniumsalzes des Heparins in einer Menge von 20 bis 50 Vol.-%, zweckmäßig von 30 bis 40 Vol.-%, zugegeben. Das Gemisch wird 5 bis 15, zweckmäßig 15 Minuten lang gerührt, dann werden die Phasen getrennt. Die wäßrige Phase wird durch eine Seitz-Filterscheibe oder eine Membran filtriert und unter Rühren durch Zugabe eines niedrigen aliphatischen Alkanols (z. B. Methanol, Ethanol) oder Alkanons (z. B. Aceton) ausgefällt.

Das ausgefällte Heparinat wird in bekannter Weise isoliert und getrocknet. Der Natriumionen-Gehalt des so gewonnenen Produktes liegt unter 0,1 Gew./Gew.-% und entspricht den Qualitätsanforderungen der USP XXI.

Ausführungsbeispiele

Das erfindungsgemäße Verfahren wird im folgenden an Hand von Beispielen näher erläutert, ist jedoch nicht auf diese beschränkt.

In den Beispielen bedeuten:

Gew./Vol.-% gemischtes Prozent;
 Vol./Vol.-%: Volumenprozent;
 Ma.-%: Masseprozent;
 M: molare Lösung;
 IE: internationale Einheit.

Beispiel 1

Aus Natriumheparinat von einwandfreier Qualität, dessen spezifische Wirksamkeit 165 IE/mg beträgt, stellt man eine Lösung von 4 Gew./Vol.-% mit pyrogenfreiem destilliertem Wasser her. Zu 100 ml dieser Lösung gibt man portionsweise 165 ml wäßrige Cetyl-pyridinium-chlorid-Lösung von 10 Gew./Vol.-%. Nach der Zugabe trennt man den abgeschiedenen Niederschlag (den Komplex aus Heparin und quaternärem Amin) durch Zentrifugieren ab. Die Masse des zentrifugierten nassen Niederschlages beträgt 16,5 g. Dieser wird in 40 ml pyrogenfreiem destilliertem Wasser suspendiert, und die Suspension wird wiederholt zentrifugiert.

Das nach dem zweiten Zentrifugieren erhaltene nasse Cetyl-pyridinium-heparinat wird unter Rühren in 200 ml 2 M Calciumchlorid-Lösung gelöst. Die Lösung wird durch Filtrieren gereinigt, und aus dem Filtrat wird das entstandene Calciumheparinat durch Zugabe von 150 Vol./Vol.-% Ethanol ausgefällt. Der durch Zentrifugieren abgesonderte Calciumheparinat-Niederschlag wird in Ethanol suspendiert, filtriert und in 200 ml pyrogenfreiem destilliertem Wasser gelöst. Zu dieser Lösung gibt man portionsweise Ethanol in einer Menge von 100 Vol./Vol.-%. Das abgeschiedene Calciumheparinat wird zentrifugiert, mit Ethanol und dann mit Aceton gewaschen und zuletzt getrocknet.

Die spezifische Wirksamkeit des so erhaltenen Calciumheparinates beträgt 162 IE/mg, sein Natriumgehalt liegt unter 0,1 Ma.-% und entspricht den Vorschriften der USP XXI.

Beispiel 2

Zu 100 ml der gemäß Beispiel 1 hergestellten Natriumheparinat-Lösung werden 160 ml einer wäßrigen Lösung von 10 Gew./Vol.-% Cetyl-trimethyl-ammonium-bromid gegeben. Der abgeschiedene Niederschlag (Komplex aus Heparin und quaternärem Amin) wird durch Zentrifugieren abgetrennt, in 40 ml pyrogenfreiem destilliertem Wasser suspendiert und erneut zentrifugiert. Die Masse des so gewonnenen Niederschlages beträgt 15,8 g. Dieser wird in 100 ml Ethanol gelöst, dann portionsweise unter Rühren zu 200 ml 0,5 M Calciumchlorid-Lösung gegeben. Die so erhaltene Calciumheparinat-Lösung wird durch Filtrieren gereinigt, dann werden dem Filtrat unter Rühren 120 ml Ethanol zugegeben. Der abgeschiedene Calciumheparinat-Niederschlag wird in Ethanol zweimal suspendiert, filtriert, mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die spezifische Wirksamkeit des so erhaltenen Calciumheparinates beträgt 167 IE/mg, sein Natriumgehalt liegt unter 0,1 Ma.-% und entspricht den Vorschriften der USP XXI.

Beispiel 3

Man geht wie im Beispiel 2 vor, mit dem Unterschied, daß anstelle von Methanol Ethanol zur Lösung des Komplexes aus Heparin und quaternärem Amin verwendet wird.

Die spezifische Wirksamkeit des so erhaltenen Calciumheparinates beträgt 165 IE/mg, sein Natriumgehalt liegt unter 0,1 Ma.-% und entspricht den Vorschriften der USP XXI.

Beispiel 4

Man geht wie im Beispiel 2 vor, mit der Änderung, daß zur Lösung des Komplexes aus Heparin und quaternärem Amin Aceton verwendet wird.

Die spezifische Wirksamkeit des so erhaltenen Calciumheparinates beträgt 161 IE/mg, sein Natriumgehalt liegt unter 0,1 Ma.-% und entspricht den Vorschriften der USP XXI.

Beispiel 5

130 ml 10 Gew./Vol.-%ige wäßrige Hyamin^R 1622 Lösung werden portionsweise zu 100 ml einer wäßrigen Lösung des gemäß Beispiel 1 hergestellten Natriumheparinates gegeben. Der abgeschiedene Komplex aus Heparin und quaternärem Amin wird zentrifugiert, dann in 45 ml Wasser suspendiert und wiederholt zentrifugiert.

Der nasse Niederschlag wird in 110 ml Isopropanol gelöst, und dieser Lösung werden 40 ml 10 Gew./Vol.-%ige wäßrige Calciumchlorid-Lösung zugegeben. Nach kräftigem Rühren von 5 Minuten Dauer läßt man das Gemisch eine halbe Stunde lang stehen. Nach Trennung der Phasen wird die wäßrige Lösung durch einen Membranfilter filtriert, dann wird das Calciumheparinat aus der Lösung durch Zugabe von 100 Vol./Vol.-% Ethanol ausgefällt.

Der abgeschiedene Calciumheparinat-Niederschlag wird zentrifugiert, dann zuerst mit Ethanol und dann mit Aceton gewaschen und zuletzt getrocknet.

Die spezifische Wirksamkeit des so erhaltenen Calciumheparinates beträgt 163,5 IE/mg, sein Natriumgehalt liegt unter 0,1 Ma.-% und entspricht den Vorschriften der USP XXI.

Beispiel 6

Man geht wie im Beispiel 5 vor, mit der Änderung, daß der Komplex aus Heparin und quaternärem Amin in n-Butanol und nicht in Isopropanol gelöst wird.

Die spezifische Wirksamkeit des so erhaltenen Produktes beträgt 167,5 IE/mg, sein Natriumgehalt liegt unter 0,1 Ma.-% und entspricht den Vorschriften der USP XXI.

Beispiel 7

Man geht wie im Beispiel 5 vor, mit der Änderung, daß der Komplex aus Heparin und quaternärem Amin in Chloroform, und nicht in Isopropanol gelöst wird.

Die spezifische Wirksamkeit des so erhaltenen Produktes beträgt 165,6 IE/mg, sein Natriumgehalt liegt unter 0,1 Ma.-% und entspricht den Vorschriften der USP XXI.

Beispiel 8

Man geht wie im Beispiel 5 vor, mit der Abwandlung, daß zur Bildung des Niederschlages Carbotetradecyl-oxymethyl-tri-methylammonium-chlorid anstelle von Hyamin^R 1622 und zur Lösung Isopropanol anstelle von n-Butanol verwendet werden.

Die spezifische Wirksamkeit des so erhaltenen Produktes beträgt 169,3 IE/mg, sein Natriumgehalt liegt unter 0,1 Ma.-% und entspricht den Vorschriften der USP XXI.

Beispiel 9

Es wird 1 Gew./Vol.-%ige Lösung von Natriumheparinat (das den medizinischen Vorschriften entspricht), dessen spezifische Wirksamkeit 158 IE/mg beträgt, in pyrogenfreiem destilliertem Wasser hergestellt.

50 ml dieser Lösung titriert man mittels eines Radiometer-Titrators (Typ TTT 2) und einer kombinierten Glaselektrode gegen eine 10 Gew./Vol.-%ige wäßrige Lösung von Hyamin^R 1622. Das Gerät registriert das in mV ausgedrückte Elektrodenpotential als Funktion des zugegebenen Reagens (Fig. 1).

Aufgrund der aufgenommenen Kurve entspricht der zum Inflexionspunkt der ersten Titrierungsstufe gehörende Wert 11,45 ml 10 Gew./Vol.-%iger wäßriger Lösung von Hyamin^R 1622.

Aufgrund der Titrierung fügt man unter Rühren portionsweise 229 ml 10 Gew./Vol.-%ige wäßrige Hyamin^R 1622 Lösung zu 1000 ml Natriumheparinat-Lösung zu. Der abgeschiedene Niederschlag wird zentrifugiert, dann in 100 ml pyrogenfreiem destilliertem Wasser suspendiert und wiederholt zentrifugiert.

Der nasse Niederschlag wird in 250 ml n-Butanol gelöst, dann werden 95 ml 0,3 M wäßrige Calciumchlorid-Lösung portionsweise zugegeben. Nach kräftigem Rühren von 5 Minuten Dauer läßt man das Gemisch stehen. Nach Trennung der Phasen wird das Calciumheparinat aus der wäßrigen Phase durch Zugabe von 100 Vol./Vol.-% Ethanol ausgefällt. Der Niederschlag wird zentrifugiert, zuerst mit Ethanol und dann mit Aceton gewaschen und getrocknet.

Die spezifische Wirksamkeit des so erhaltenen Produktes beträgt 177 IE/mg, sein Natriumgehalt liegt unter 0,1 Ma.-% und entspricht den Vorschriften der USP XXI.

Die Ausbeute beträgt 98,9%.

Beispiel 10

Man geht wie im Beispiel 9 vor, mit der Abänderung, daß eine äquivalente Menge einer Lithiumchlorid-Lösung anstelle der Calciumchlorid-Lösung verwendet wird.

Die spezifische Wirksamkeit des so erhaltenen Produktes beträgt 181 IE/mg, sein Natriumgehalt liegt unter 0,1 Ma.-%.

Die Ausbeute beträgt 97,8%.

Beispiel 11

Man geht wie im Beispiel 9 vor, mit dem Unterschied, daß eine äquivalente Menge einer Magnesiumchlorid-Lösung anstelle der Calciumchlorid-Lösung verwendet wird.

Die spezifische Wirksamkeit des so erhaltenen Produktes beträgt 173 IE/mg, sein Natriumgehalt liegt unter 0,5 Ma.-%.

Die Ausbeute beträgt 99,2%.

Beispiel 12

Man geht wie im Beispiel 9 vor, mit dem Unterschied, daß anstelle von Calciumchlorid Ammoniumchlorid verwendet wird.

Die spezifische Wirksamkeit des so erhaltenen Produktes beträgt 183 IE/mg und sein Natriumgehalt liegt unter 0,1 Ma.-%.

Die Ausbeute beträgt 97,0%.

Beispiel 13

Man geht wie im Beispiel 9 vor, mit der Abänderung, daß Kaliumchlorid anstelle von Calciumchlorid verwendet wird.

Die spezifische Wirksamkeit des so erhaltenen Produktes beträgt 174 IE/mg und sein Natriumgehalt liegt unter 0,1 Ma.-%.

Die Ausbeute beträgt 96,8%.

Beispiel 14

Aus einem 150 γ/g Schwermetallion enthaltenden rohen Natriumheparinat (ein eiweißfreies Rohprodukt mit einer spezifischen Wirksamkeit von 130 IE/mg) stellt man nach der Befreiung von Pyrogen 200 I einer wäßrigen Lösung mit einer Konzentration von 3250 IE Heparin/ml her. Zu dieser Lösung gibt man portionsweise 104 I 10 Gew./Vol.-%ige wäßrige Lösung von Hyamin^R 1622. (Die Menge der Lösung von Hyamin^R 1622 wurde nach der im Beispiel 9 beschriebenen potentiometrischen Titrierung bestimmt.)

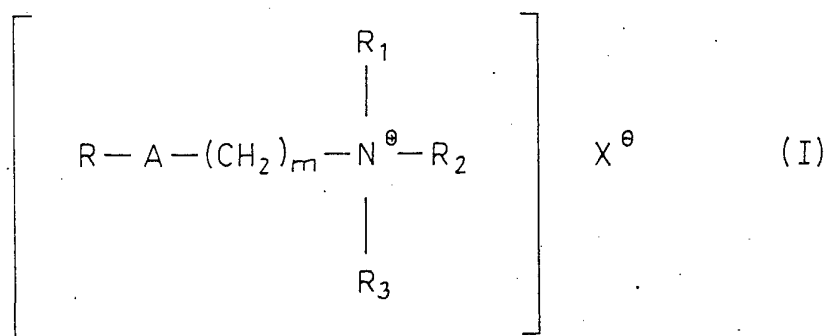
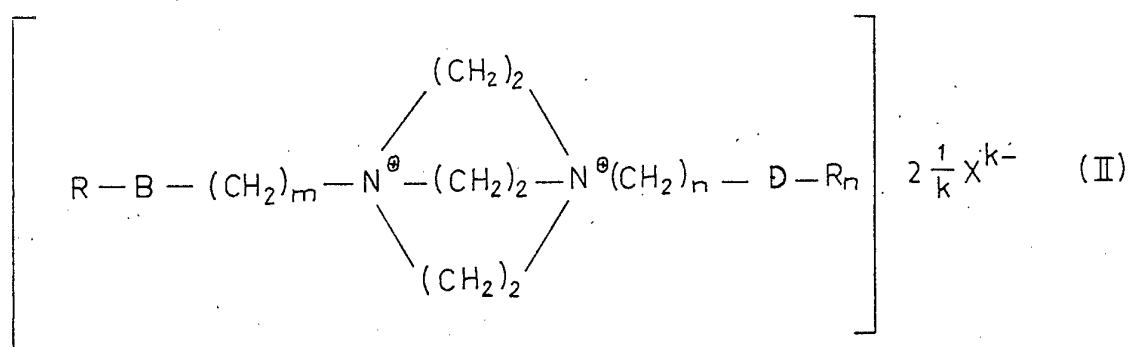
Der abgeschiedene Niederschlag wird in einer Absetzzentrifuge zentrifugiert, dann in 30 I pyrogenfreiem destilliertem Wasser suspendiert und wiederholt zentrifugiert.

Der nasse Niederschlag wird in 90l n-Butanol gelöst, woraufhin 30l 4Gew./Vol.-%ige wäßrige Calciumchlorid-Lösung zugegeben werden. Man rührt das Gemisch 5 Minuten lang und füllt es dann in eine Glasbirne von 150l Inhalt, die mit einem Rührer und einem unteren Ablaufhahn versehen ist. Nach Trennung der Phasen trennt man die untere wäßrige Phase ab, dann werden 10l 4Gew./Vol.-%ige wäßrige Calciumchlorid-Lösung portionsweise zur butanolischen Phase gegeben. Nach einem Rühren von 5 Minuten Dauer und nach Trennung der Phasen sondert man die wäßrige Phase ab, woraufhin beide wäßrigen Phasen vereinigt werden.

Die vereinigte wäßrige Phase wird filtriert, und dann wird das gelöste Calciumheparinat durch Zugabe von 100Vol./Vol.-% Ethanol ausgefällt. Der abgeschiedene Niederschlag wird zuerst mit Ethanol und dann mit Aceton gewaschen und abschließend im Vakuum getrocknet.

Die Masse des so erhaltenen Calciumheparinates beträgt 3760g mit einer spezifischen Wirksamkeit von 170IE/mg und mit einem Natriumgehalt unter 0,1 Masse. Die Reinheit entspricht den Anforderungen der USP XXI.

Falls die Herstellung eines ein von Calcium abweichendes Kation enthaltenden Heparinates angestrebt wird, können sinngemäß andere Salzlösungen der gleichen Molarität anstelle von der Calciumchlorid-Lösung verwendet werden.



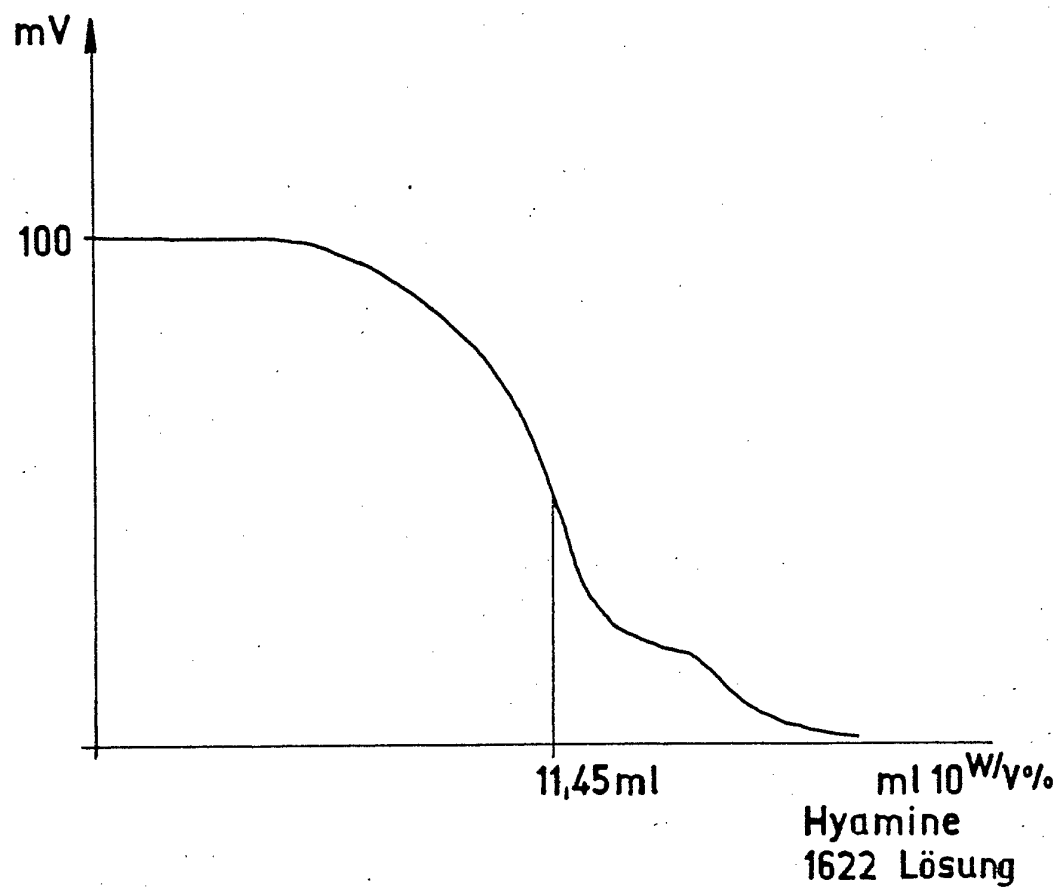


Abb. 1.