



Patent dodatkowy  
do patentu

Zgłoszono: 31.I.1964 (P 103 593)

Pierwszeństwo:

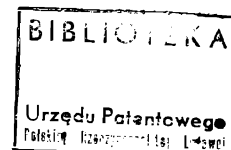
Opublikowano: 12.X.1965

KL. 30h, 2/10

MKP A 61 k

17/04

UKD



Twórca wynalazku: mgr inż. Ryszard Kojer

Właściciel patentu: Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”,  
Warszawa (Polska)

### Sposób otrzymywania insuliny

1

W znanych sposobach otrzymywania insuliny jedną z podstawowych faz procesu jest destylacja próżniowa (zagęszczanie) alkoholowych ekstraktów z trzustki. Proces ten wpływa jednak szkodliwie na trwałość hormonu, dlatego też starano się wydzielać insulinę w inny sposób. Według niektórych danych z literatury (T. Schibata, Huk, Acta Med. 43. 278, 1952 — ref. C. A. 47. 2433, 1953) jak również nielicznych patentów proponowano wytrącać insulinę z alkoholowego ekstraktu trzustki za pomocą soli cynkowych (np. indyjski opis patentowy nr 43 403 i japoński opis patentowy nr 5448).

W pierwszym z cytowanych opisów patentowych dla wytrącenia insuliny z ekstraktu etanolowego zastosowano chlorek cynkowy i wodorotlenek amonu. Po długim i złożonym procesie technologicznym, a mianowicie: strąceniu w mocnym etanolu, dializie, strąceniu kwasem tróchloroocetowym i przeprowadzeniu przez punkty izoelektryczne, uzyskiwano preparat insuliny o mocy fizjologicznej zaledwie około 8—10 jednostek w 1 mg.

W drugim opisie patentowym zastosowano ekstrakcję metanolową trzustki wielorybiej, a następnie użyto siarczian cynkowy wobec wodorotlenku amonu jako czynnika strącającego insulinę z tego układu. Uzyskiwano w końcu w miarę oczyszczonej insulinę o mocy 19 jednostek w 1 mg przy stosunkowo niskiej wydajności około 730 jednostek z 1 kg trzustki.

Stwierdzono, że można uzyskać insulinę z wy-

2

wysoką wydajnością przy zastosowaniu wytrącania insuliny solami cynku z ekstraktu alkoholowego, następnego rozpuszczania, wysalania i ekstrakcji acetonem. Cel ten osiąga się zgodnie z wynalazkiem w ten sposób, że insulinę ekstrahuje się z trzustki zwierzęcej słabym roztworem zakwaszonego metanolu, a następnie wytrąca się ją solami cynku zwłaszcza octanem cynku w środowisku słabo alkalicznym w obecności buforu octanowego. W dalszych fazach procesu technologicznego osad rozpuszcza się w kwasie solnym a następnie wysala chlorkiem sodu.

Wysolone równocześnie z insuliną substancje balastowe (barwniki i lipoidy) wymywa się acetonem i dalszy proces prowadzi znanymi sposobami (otrzymywanie bezpostaciowej insuliny cynkowej i krystalizacja). Wiadomym jest, że insulina jako hormon, w skład którego wchodzi jon cynkowy, ma powinowactwo do tego metalu.

Jednak wobec złożonej i nietrwałej budowy cząsteczki insuliny, wszelkie procesy chemicznego wiązania jej z cynkiem powinny być prowadzone w możliwie najłagodniejszych warunkach, o ile ma pozostać nienaruszona struktura wewnętrzna hormonu. Stwierdzono, że cel ten osiąga się, jeżeli insulinę wytrąca z ekstraktu metanolowego solami cynku w środowisku słabo alkalicznym w obecności octanów. Jednakże, jak wiadomo, cząsteczka insuliny jest stosunkowo nietrwała w środowisku alkalicznym. Proces rozkładu jest zaś szcze-

gólnie szybki w obecności pankreatycznych enzymów trawiennych działających optymalnie w środowisku alkalicznym.

Stwierdzono, że przy wytrącaniu insuliny jonami cynku w środowisku słabo alkalicznym wobec octanowego układu buforującego — nie tylko unika się rozkładu w cząsteczce insuliny, ale również zostają zahamowane enzymatyczne procesy trawienne. Sposób według wynalazku opiera się na teorii wytwarzania wewnętrznych soli kompleksowych aminokwasów, z których zbudowana jest cząsteczka insuliny. Np. reakcja między cynkiem i kwasem alfa-aminooctowym przebiega jak podano na rysunku, na którym  $X$  oznacza anion.

W procesie tym powstaje wewnętrzna sól kompleksowa, w której cynk swoimi wartościowościami głównymi wiąże się z grupami karboksylowymi, a wartościowościami pobocznymi z grupami aminowymi oraz uwalnia się kwas.

Przy zastosowaniu soli cynkowych w technologii wytrącania insuliny zachodzi proces wiązania jonów cynku prawdopodobnie w postaci kompleksowych połączeń. Użycie w sposobie według wynalazku octanu cynku ułatwia proces kompleksowania się, właśnie dzięki słabej dysocjacji wytwarzającego się kwasu octowego. Przesunięcie całego układu do środowiska słabo alkalicznego ( $pH = 7,3-7,5$ ) powoduje nasilenie procesu wiązania jonów cynku oraz procesu asocjacji i agregacji cząstek insuliny.

W sposobie według wynalazku przy zastosowaniu nadmiaru jonów cynku w środowisku słabo alkalicznym następuje wydzielanie się koloidalnego osadu wodorotlenku cynku, który okłuduje kompleksy insulinowo-cynkowe i złożone związki cynkowe (z barwnikami, lipidami i peptydami) i powoduje ich całkowite wytrącenie z roztworu alkoholowego. Zawartość insuliny w osadzie jest stosunkowo niewielka (ułamek procentu). W dalszej fazie sposobu według wynalazku odsączony osad rozpuszcza się w 1—2% roztworze kwasu solnego przy wartości  $pH$  około 2,5 i wysala chlorkiem sodu. Osad oddziela się od cieczy i zawiesza się w 10-krotnej ilości acetonu, miesza i sączy. Stwier-

dzono, że aceton umożliwia jednocześnie wymycie balastowych tłuszczów i barwników. Po wymyciu substancji balastowych proces prowadzi się dalej znanym sposobem do uzyskania insuliny w postaci krystalicznej.

Przykład. 3 kg mieszanej trzustki wieprzowo-wołowej ekstrahuje się 4—7 litrami metanolu zakwaszonego 40—50 ml kwasu siarkowego. Po odsączeniu do przesączu dodaje się niewielką ilość kwasu octowego i około 30 g octanu cynku w roztworze a następnie wodorotlenku sodu do osiągnięcia wartości  $pH = 7,3-7,5$ . Wypada kłaczkowaty osad. Po zlewarowaniu roztworu osad odsącza się i rozpuszcza się w 200—300 ml. 1—2% owego kwasu solnego aż do uzyskania w roztworze wartości  $pH =$  około 2,5. Do otrzymanej mętnej cieczy dodaje się chlorku sodowego do pełnego nasycenia. Wysolony osad oddziela się od cieczy i zawiesza w 10-krotnej ilości acetonu. Zawiesinę dobrze się miesza i odsącza. Do roztworu przechodzą barwniki i tłuszcze a w osadzie pozostaje insulina (obok innych substancji). Dalsze fazy procesu (strącenie bezpostaciowej insuliny cynkowej i krystalizacja), prowadzi się znanym sposobem. Uzyskuje się około 120—170 mg krystalicznej insuliny o mocy 21—24 j/mg i normalnej zawartości cynku.

#### Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania insuliny przez ekstrakcję z trzustki za pomocą alkoholu zwłaszcza metanolu, wydzielenie jej z ekstraktu na drodze wytrącenia, **znamienny tym**, że ekstrakt insuliny traktuje się octanem cynku w środowisku buforowanym octanami i doprowadza wartość  $pH$  środowiska do około 7,3—7,5, przy czym insulina wytrąca się całkowicie z roztworu w postaci kompleksu z cynkiem, a otrzymany osad rozpuszcza się w rozcieńczonym kwasie solnym, po czym wysala z roztworu osad, który traktuje się acetonem w celu usunięcia substancji balastowych, przede wszystkim barwników i tłuszczów, po czym dalsze oczyszczanie insuliny prowadzi się w znany sposób.

