



ÚŘAD PRO VYNALEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

248011
(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴
A 61 K 31/725

(22) Přihlášeno 19 03 80

(21) [PV 1897-80]

(32) (31) (33) Právo přednosti od 21 03 79
(RI-705) Maďarská lidová republika

(40) Zveřejněno 12 06 86

(45) Vydáno 15 08 88

(72)

Autor vynálezu

TAKÁCS ISTVÁN dr. ing., KEREY GYÖRGY ing., ILLÉS JÁNOS ing.,
RUDOLF PÉTER ing., GERE PÁL ing., CZEBE LÁSZLÓ dr.,
NESZMÉLYI ERZSÉBET ing., BUDAPEŠT (MLR)

(73)

Majitel patentu

RICHTER GEDEON VEGYÉSZETI GYÁR R.T., BUDAPEŠT (MLR)

(54) Způsob přípravy vodných extraktů stálého složení s nízkým obsahem tuků a dalších znečišťujících složek a s vysokým obsahem heparinu

1

2

Suchý, amorfni koncentrát, který si zachovává svoji granulovanou formu, s hmotnostním obsahem sušiny v rozmezí od 90 do 95 %, a s velkým specifickým povrchem, získaným tak, že se podrobí vodná suspenze rozřezaných živočišných tkání, obsahujících heparin, autolýze, přičemž po autolýze se suspenze podrobí tepelnému zpracování při teplotě 75 až 100 °C a takto získaný vysrážený komplex se oddělí a suší na obsah 90 až 95 % hmotnostních sušiny, se podrobí při teplotě v rozmezí od 20 do 80 °C kontinuální nebo přerušované protiproudé extrakci vodným roztokem chloridu sodného o koncentraci 1,5 až 12 % hmotnostních, který se zalkalizuje hydroxidem sodným na hodnotu pH v rozmezí od 8 do 12,8.

Připraví se extrakty o mimořádně vysoké koncentraci aktivní složky, nejméně 120 m. j./ml, s konstantním složením a obsahujícími minimální množství škodlivých složek, přičemž postup je méně náročný na energii, chemická činidla i pracnost.

Vynález se týká způsobu přípravy vodných extraktů stálého složení s nízkým obsahem tuků a dalších znečišťujících složek a s vysokým obsahem heparinu, přičemž se vychází z amorfni suroviny obohacené heparinem, která si zachovává svoji granulovanou formu, s obsahem 90 až 95 % hmotnostních sušiny a s velkým specifickým povrchem.

Všeobecně je známo, že zpracovávání živočišných orgánů obsahujících heparin, je nákladný a složitý postup, přičemž je možno tento postup realizovat jako extrakční postup prováděný v několika následných stupních s rozdílným zaměřením. V praxi není možno způsob extrakce živočišných orgánů oddělit od předběžného shromažďování a konzervování živočišných orgánů obsahujících heparin, přičemž tyto fáze významně ovlivňují provedení extrakce v průmyslovém měřítku a rovněž i dosažitelný výtěžek.

Postupy extrakce heparinu jsou časově náročné, přičemž jejich reprodukovatelnost je mnohdy sporná. Z výše uvedeného vyplývá, proč se jak technická, tak i patentová literatura tak intenzivně zabývá extrakčními postupy z hlediska technologické i ekonomické účinnosti výroby heparinu jako celku.

Je evidentní, že nejdůležitějším problémem extrakce je najít způsob nejúčinnějšího rozpuštění obsahu aktivní látky (heparinu) přítomné v různých typech surovin, které se zpracovávají po shromáždění a uskladnění orgánů, přičemž by při tomto způsobu nedocházelo k poškození a rozštěpení přítomné aktivní látky a tím i ke snížení jejího obsahu.

Dalším problémem je izolace konečného produktu ve farmaceuticky vyhovující kvalitě z vodných roztoků, obsahujících heparin, které byly získány při extrakci, a to ve vyhovujícím výtěžku, přičemž bylo použito jen několika provozních stupňů.

Pro tento účel je nutné, aby v kapalném extraktu, obsahujícím heparin, bylo přítomno co možno nejmenší množství nečistot, jako jsou například heparinoidové pyrogeny, barvicí polypeptidy, které ztěžují čištění. Co možno nejdříve selektivní rozpouštění heparinu je nutné z toho důvodu, že přítomnost ostatních složek, obsažených v extraktu, získanému ze živočišných orgánů, jako jsou tuky, pipoidy, proteiny, peptidy a anorganické soli, inhibují izolaci heparinu, to znamená, že snižují možný výtěžek aktivní složky, dále znečišťují zařízení a konečný produkt není vždy plně vyčistitelný ode všech vedlejších složek.

Uvedené problémy nebyly dosud při zpracovávání známých druhů surovin extrakčními postupy na známých zařízeních úspěšně odstraněny.

Pokud se týká dosavadního stavu techniky, jsou známy tři následující základní postupy extrakce živočišných orgánů obsahujících heparin.

První teoreticky vypracovaná metoda extrakce byla publikována Charlesem a Scottem v J. Biol. Chem. 102, 425, 1933. Tento extrakční postup je charakterizován použitím hydrolyzačních enzymů, přítomných v přežívajících tkáních po extrakci orgánů, obsahujících heparin, rozkrájených a převážně silně zmrazených. Autolýza probíhá po delší dobu a poté se za účelem zkoagulování extraktu použije mírně alkalického solného roztoku a směs se vaří. Tyto postupy, při kterých se používá autolýzy, jsou popsány v patentech Spojených států amerických č. 2 571 697 a 2 797 184. Autolýzu je možno kombinovat s další extrakcí, čímž se dosáhne dalšího zlešení tohoto postupu, což je popsáno v patentech Spojených států amerických č. 2 884 358 a 3 016 331.

Nevýhody extrakce pomocí autolýzy jsou popsány v maďarském patentu č. 148 776 a v patentu Spojených států amerických č. 2 587 924. Nevýhody zjištěné na základě experimentálních výzkumů je možno shrnout do několika bodů:

I když budeme při extrakci předpokládat rovnovážný stav mezi extrakčním roztokem a extrahovaným živočišným orgánem, přesto vzhledem k vysokému obsahu vlhkosti v extrahovaném živočišném orgánu je nutno počítat se značnou ztrátou heparinu. Oddělení extrahovaného orgánu s sebou nezbytně nese i odstranění vlhkosti ze systému, a tudíž i roztoku heparinu. Vzhledem k rozdílnému stupni autolýzy média nenastává rovnovážný stav mezi extrahovaným orgánem a extrakční kapalinou v každém stadiu, a v takových fázích je ztráta na heparinu přirozeně vyšší.

Během skladování orgánů před autolýzou o během autolýzy se rovněž zvyšuje počet mikroorganismů, které působí nepříznivým způsobem na heparin, což má za následek, že klesá výtěžnost, přičemž bakteriální kontaminace je nežádoucím jevem i z dalších hledisek, jako je pyrogenita, toxicita a podobně.

Jeden z hlavních problémů metod, při kterých se používá autolýzy, spočívá ve shromažďování živočišných orgánů, z čehož vyplývá nestejně složení získávaného extraktu. Vzhledem k velkému zpracovávanému objemu je významným rovněž požadavek na velikost, resp. uspořádání zařízení, potřebného pro tuto fázi výroby. Provedení postupu z hlediska průmyslové výroby je možné jen tehdy, jestliže se zmenší objem suroviny na takovou míru, aby se mohl získávat produkt obsahující heparin o čistotě alespoň 1 až 10 %. Vzhledem k variabilitě složení se kvalita získávaného produktu mění a z tohoto důvodu je obtížné realizovat ekonomicky výhodnou výrobu.

U druhého typu extrakčních metod se obsah aktivní látky ze živočišných orgánů obsahujících heparin extrahuje pomocí chemických činidel, přičemž tyto postupy za-

hrnují rozpouštění heparinu nebo heparin-proteinového komplexu. Takovéto postupy jsou například popsány v maďarských patentech č. 148 776 a 149 339, v patentu Velké Británie č. 992 201 a v patentech Spojených států amerických č. 2 623 001, 3 058 884 a 3 262 854. Extrakce rozpouštědlem má však nevýhodu mimo jiné v tom, že obdobně jako u autolýzy se musí ze systému oddělovat zbytky živočišných orgánů o vysokém obsahu vlhkosti, což způsobuje značné ztráty na heparinu, dosahující 20 až 40 %, a to v závislosti na koncentraci sušiny organické látky v extrakčním zbytku, jak je uvedeno v příkladu v maďarském patentu č. 148 776 ve srovnání s postupem podle patentu Velké Británie č. 992 201. Rovněž u této metody je nepříznivým jevem proměnlivé složení použitých živočišných orgánů, způsobující obdobně nerovnoměrnost složení získaného extraktu a nejistou reprodukovatelnost v dalších fázích výroby.

Vzhledem k těmto potížím se navrhuje například v patentu Spojených států amerických č. 2 623 001 dialýza ve velkém objemu, po dlouhý časový interval, provedená po extrakci. Způsob popsáný v patentu Spojených států amerických č. 3 262 854 používá organického rozpouštědla jako nutné látky ve fázi extrakce, pracující s velkým objemem.

Když se shrnou postupy v první skupině, kde se používá autolýzy a ve druhé skupině, kde se pracuje pouze s extrakcí za pomoci chemických činidel, je možno u těchto metod zjistit společnou nevýhodu spočívající v tom, že během extrakce, již je zpravidla souprůdný proces prováděný v jednom nebo ve dvou stupních podle konzistence surovin všeobecně až dosud používaných, získané roztoky obsahují řadu příměsí a škodlivých nečistot. Koncentrace heparinu v těchto roztocích je velmi zředěná a činí 10 až 20 m. j./ml nebo v průměru 0,01 %. Z toho vyplývá, že k rozpuštění 1 000 miliónů m. j., to jest 6,5 kg heparinu se extrakce provádí v objemu 50 000 až 100 000 litrů při minimálně 20% ztrátě na heparinu.

Ve třetí skupině extrakčních metod se ze účelem snížení ztrát na heparinu a vyloučení nespolehlivosti u autolýzy, živočišné orgány obsahující heparin podrobují bez pomoci chemických činidel intenzivní a dlouhodobé proteolýze vedoucí až k téměř úplnému nebo úplnému rozpuštění za použití enzymu jako je trypsin, extrakt pankreatu, papain, dodaného dodatečně do uvedeného systému. Takovéto postupy jsou například popsány v maďarském patentu č. 147 323, a dále ještě v patentech Spojených států amerických 2 587 924, 2 989 438 a 3 817 924, a rovněž tak i v patentech Spojených států amerických č. 2 884 358 a 3 016 331, kde se používá kombinace autolýzy a enzymatické proteolýzy.

Přes nesporné výhody účinků takového postupu je ekonomická účinnost této uvede-

né extrakce závislá na nákladech, spojených se spotřebou proteolytického enzymu nezbytného pro jednotlivá specifická množství živočišných orgánů. Například je možno uvést, že v jednom z uvedených postupů je nutno přidat 1,5 až 3 kilogramy pankreatu nebo pankreatických zbytků ke 2 kilogramům živočišných orgánů obsahujících heparin.

Jestliže se sníží specifická množství přidávaných enzymů, proteolýza a filtrace se mimořádně prodlouží. Podle patentu Spojených států amerických č. 3 817 831 trvá pepsinová autolýza 24 hodin, autolýza prováděná s pankreatinem trvá 15 hodin, načež potom se provede hrubá filtrace a po uplynutí 24 hodin se provede ultrafiltrace. Mimořádnou nevýhodou je to, že u těchto časově dlouhých postupů vzrůstá riziko bakteriální kontaminace a dále vzrůstá nebezpečí rozštěpení heparinu účinkem enzymů přítomných v těchto postupech, dodávaných zvnějšku a narušujících glukosidové vazby heparinu nebo jiných štěpicích enzymů.

Výsledkem úplné nebo téměř úplné proteolýzy je to, že se rozpustí složky přítomné v živočišných orgánech a doprovázející heparin. Jsou to například sloučeniny typu sli-zovitých polysacharidů, deriváty kyseliny nukleové, tuky, lipoidy, které významně významně zhoršují rychlost a účinnost dalšího postupu. Podle příkladu 3 uvedeného v patentu Spojených států amerických číslo 3 817 831 po ukončení proteolýzy a hrubé filtraci činí obsah organické sušiny 10 až 35 %, to znamená že je třikrát vyšší při obsahu 0,027 % heparinu v odváděném roztoku. Z uvedeného důvodu je vypouštění zpracovaných roztoků, zbavených aktivní látky, do veřejných odpadních toků problematické a dochází při něm ke znečišťování vod.

Při postupech používajících ke zpracovávání živočišných orgánů proteolýzu je produktem zředěný roztok o koncentraci 6,45 m. j./ml, to jest 0,004 až 0,03 %. V koncentrovanějších roztocích nemůže proteolýza probíhat vzhledem ke zvětšující se substrátové inhibici.

Extrakce živočišných orgánů, to jest rozpouštění heparinu v nich obsaženého, a účinné a reprodukovatelné snížení objemu roztoků je nejdelší a nejsložitější fází celého výrobního postupu, zaměřeného na výrobu tohoto farmaceuticky použitelného produktu. Extrakce je časově náročná a vzhledem k proteolýze a/nebo vzhledem k řadě chemicko-fyzikálních postupů se provádí v několika stupních, protože nízká koncentrace aktivní látky nezbytně s sebou nese nutnost použití zařízení a postupu pracujícího s velkým objemem zpracovávané suroviny. Ekonomická účinnost chemické extrakce je nepříznivě ovlivňována použitými chemickými látkami a náklady na enzymy pro proteolytickou extrakci. Při těchto postupech je reprodukovatelnost nejistá, pro-

tože vzhledem k rozdílnému systému shromažďování a skladovacím metodám živočišných orgánů se obsah aktivní látky pohybuje v širokých mezích. Současně je další zpracovávání nepříznivě ovlivňováno nečistotami obsaženými v několikanásobně větším množství.

Z těchto důvodů běžně praktikované metody shromažďování živočišných orgánů, používaných pro výrobu heparinu, neumožňují získat konečný produkt farmaceuticky použitelné jakosti beze ztráty nebo pouze s malou ztrátou na heparinu, vzhledem k běžnému velkoobjemovému skladování živočišných orgánů. Extrakční metody se musely přizpůsobit jakosti výchozího materiálu. Na druhé straně nerovnoměrnost v jakosti tohoto materiálu vedla k tomu, že se při extrakci musely zavést takové operace, které měly protichůdný účinek na selektivní extrakci heparinu a zvýšily tak složitost této metody.

Mimořádně důležitým technickým úkolem se tak stalo navrhnout zjednodušený extrakční postup pro výrobu heparinu ze živočišných orgánů, při kterém by byl zkrácen výrobní čas tohoto postupu, dále by byl zvýšen ekonomický účinek této výroby a zlepšila selektivita. Z těchto úkolů se vycházelo při vypracovávání postupu podle uvedeného vynálezu.

Podstata způsobu přípravy vodných extraktů stálého složení a s nízkým obsahem tuků a dalších znečišťujících složek a s vysokým obsahem heparinu, přinejmenším 120 m. j./ml, přičemž se vychází ze suchého, amorfního koncentráту, který si zachovává svoji granulovanou formu, s hmotnostním obsahem sušiny v rozmezí od 90 do 95 % a s velkým specifickým povrchem, získaným tak, že se podrobí vodná suspenze rozřezaných živočišných tkání autolýze, přičemž po autolýze se suspenze tepelně zpracuje při teplotě v rozmezí od 75 do 100 °C a takto získaný vysrážený komplex obsahující heparin se oddělí a oddělená sraženina se suší na obsah 90 až 95 % hmotnostních sušiny, podle uvedeného vynálezu spočívá v tom, že se tento suchý granulovaný koncentrát, obsahující heparin, podrobí při teplotě v rozmezí od 20 do 80 °C kontinuální nebo přerušované protiproudé extrakci vodným roztokem chloridu sodného o koncentraci v rozmezí od 1,5 do 12 % hmotnostních, který se zalkalizuje hydroxidem sodným na hodnotu pH v rozmezí od 8 do 12,8.

Výhodu postupu podle uvedeného vynálezu spočívají ve stručnosti v tom, že je možno tímto postupem připravit extrakty o mimořádně vysoké koncentraci aktivní složky, nejméně 120 m. j./ml, o konstantním složení, které obsahují minimální množství škodlivých znečišťujících složek, přičemž tato metoda je ve srovnání s dřívějšími metodami méně náročná na energii, chemická činidla i na pracnost. Podrobně bude o výhodách postupu podle vynálezu ve srovnání

s dosavadním stavem techniky pojednáno v dalším.

Poměr extrahovaného materiálu a extrakční kapaliny se řídí během protiproudé extrakce podle vynálezu tak, aby byl získán extrakt, jehož aktivita heparinu je alespoň 150 m. j./ml. Ve výhodném provedení se udržuje teplota, hodnota pH a koncentrace chloridu sodného při provádění extrakčního postupu na konstantní úrovni. Při vhodném nastavení poměru extrakčního roztoku chloridu sodného k množství suchého heparinového koncentráту, který je zpracováván (a který v případě kontinuální protiproudé extrakce je výhodně asi 5:1), je možno dosáhnout v produkovaném vodném heparinovém extraktu koncentrace heparinu v rozmezí od 150 do 300 m. j./ml.

Protiproudý extrakční postup podle vynálezu je možno provádět, jak již bylo uvedeno, kontinuálním způsobem nebo přerušovaným způsobem, přičemž ve výhodném provedení je možno tento postup provádět ve vibračním U-extraktoru, rozděleném do komor. Tuto extrakci je možno provádět v jediném zařízení.

Fyzikální vlastnosti dosud používaných výchozích surovin obsahujících heparin dosud znemožňovaly použití protiproudé extrakce k výrobě extraktů s vysokým obsahem heparinu. Podle uvedeného postupu bylo zjištěno, že pouze při protiproudé extrakci suchého granulovaného koncentráту s hmotnostním obsahem sušiny v rozmezí od 90 do 95 % a s velkým specifickým povrchem podle vynálezu je možno dosáhnout velmi účinné extrakce, přičemž se získají extrakty s vysokým obsahem heparinu, přinejmenším 120 m. j./ml. Možnost extrahovat heparin protiproudým způsobem nebyla dosud známa z toho prostého důvodu, že výchozí materiál, obsahující heparin, tzn. rozemlněné tkáně, různé kapalně, polopevně nebo jiné suroviny, který byl při dosavadních postupech používán, nemohl být protiproudým způsobem vůbec zpracováván.

Postup podle uvedeného vynálezu je možno provádět v U-extraktoru, který je popsán v maďarském patentu č. 159 977, který kromě použití pro extrakci léčivých rostlin může být rovněž velmi účinně využit pro postup podle vynálezu pro přípravu vodných extraktů s vysokým obsahem heparinu.

Při provádění zpracovávání v tomto zařízení se granulovaný materiál, obsahující heparin, který je určen k extrahování, stejnoměrně postříkuje rozpouštědlem nebo roztokem ještě předtím, než vstupuje do extraktoru za účelem homogenního zvlhčení tohoto materiálu a snadnějšího provedení extrakce, přičemž potom následuje další postříkování stejným nebo jiným rozpouštědlem nebo roztokem, přičemž množství tohoto roztoku nebo rozpouštědla převyšuje absorpční schopnost tohoto pevného surového materiálu. Potom se tento pevný podíl

a kapalná fáze vedou společně do extraktoru, přičemž se vedou ve stejném směru, ale rozdílnou rychlostí, přičemž rychlost pevné fáze odpovídá pohybu komor tohoto extraktoru. Roztok se odvádí výstupem, přičemž zbývající pevná fáze se vede do kontaktu s kapalnou fází v extraktoru, která se pohybuje opačným směrem, a nakonec se vede protiproudou sekci, ve které rozpouštědlo postupuje pevnou fází. Extraktor je vybaven systémem komor, přičemž je zabráněno možnosti zpětného mísení vodných extraktů mezi komorami. Současně vibrační jednotky značně usnadňují trvalé udržování extrakční rovnováhy po stanovený určitý časový interval. Při provádění postupu v tomto zařízení je výhodné to, že jak poměr extrakční kapaliny k extrahovanému materiálu, tak i doba extrakce, a rovněž tak délka extrakční dráhy se mohou významně zkrátit, resp. zmenšit.

Při provádění postupu podle uvedeného vynálezu se používá heparinem obohacená amorfni surovina, zachovávající si svoji granulovanou formu ze živočišných orgánů, v suchém stavu, s velkým specifickým povrchem, která se připraví postupem podle patentu Velké Británie č. 2 045 272.

Surový materiál obsahující heparin, s obohaceným obsahem aktivní složky, o konstantním složení, s nízkým obsahem tuků a zárodků mikroorganismů, který je skladovatelný beze změny morfologie a obsahu účinné složky, získaný ze živočišných orgánů, který se používá jako výchozí materiál při postupu podle uvedeného vynálezu, se připraví ze shromážděných živočišných orgánů, obsahujících heparin, které se případně rozřežou, v kapalném prostředí zpracováním při teplotě v rozmezí od 10 do 50 °C po dobu v rozmezí od 0,15 do 15 hodin. Komplex obsahující heparin, který je nerozpustný ve vodě, se potom oddělí od předběžně zpracované suspenze při teplotě v rozmezí od 75 do 100 °C, přičemž tento komplex se potom převede na snadno filtrovatelné agregované částice dalším tepelným zpracováním. Takto vzniklá sraženina se oddělí a izolovaný surový materiál obsahující heparin se suší při teplotě 100 °C, přičemž se získá produkt s obsahem 90 až 95 procent sušiny, který má drobný charakter.

Výchozím surovým materiálem je ve výhodném provedení sliznice z prasat, seróza, plíce z hovězího dobytka, přičemž je ale možno použít i jiné živočišné orgány obsahující heparin, jako je například sliznice tenkého střeva z hovězího dobytka, z ovcí, další jiné vnitřnosti a játra.

V případech, kdy se použije sliznice, potom není nutné použít rozřezávání a zředování vodou.

Ostatní živočišné orgány se rozřezávají na části o velikosti v rozmezí od 4 do 6 milimetrů, přičemž se z nich připraví vodná suspenze, která obsahuje heparin a protein

v různém stupni rozpuštění a rovněž ve formě koloidního roztoku.

Vodná suspenze se potom upraví na obsah sušiny v rozmezí od 1,5 do 17 %. Zředění se provádí vodou, ve výhodném provedení o teplotě v rozmezí od 36 do 42 °C. Z tohoto důvodu není vnější zahřívání při předběžném zpracovávání nezbytné nebo se zahřívání používá pouze v malé míře.

Jestliže se vychází z běžného materiálu obsahujícího heparin, potom se získaná suspenze předběžně zpracuje při teplotě asi 30 °C po dobu obvykle v rozmezí od 2 do 6 hodin.

Po předběžném zpracování se vysrážený heparin-proteinový komplex uvede do styku s párou nebo se tepelně zpracuje po delší časový interval, přičemž se hlavní podíl heparinu váže na filtrovatelné proteiny.

Toto tepelné zpracovávání se provádí kontinuálním způsobem při teplotě 85 °C nebo při teplotě vyšší po dobu minimálně 2 minuty a v případě přerušovaného provedení tohoto postupu po dobu 15 minut nebo ještě déle.

Vysrážením proteinů se dosáhne vhodné velikosti aglomerovaných částic, což je příznivé pro oddělování filtrační, přičemž se současně zničí škodlivé zárodky mikroorganismů. Sraženina s obsahem sušiny v rozmezí od 20 do 25 % se izoluje v mechanickém usazováku, který pracuje na principu gravitační síly.

Tento mechanický separátor má kontinuálně se obnovující filtrační povrch, přičemž je rovněž možno použít kontinuálních nebo diskontinuálních plochých sít, zakřivených sít, odstředivek nebo šnekových separátorů.

Odvedený filtrát může obsahovat 5 až 25 procent původního obsahu sušiny a v závislosti na kontrolovaném předběžném zpracovávání je složen z proteinů tepelně nedenaurovatelných, peptidů, derivátů kyseliny nukleové, tuků, lipidů a minerálních solí.

Izolovaný heparinový koncentrát se suší v sušicím zařízení při teplotě 100 °C na obsah sušiny v rozmezí od 90 do 95 %, přičemž se tímto způsobem získá koncentrát s nízkým obsahem tuků o velikosti částic v rozmezí od 0,2 do 1,6 milimetru ve formě amorfních částic o velkém povrchu, které jsou skladovatelné po dlouhý časový interval, přičemž tento materiál je zvláště vhodný pro extrakci heparinu.

Výhody postupu podle uvedeného vynálezu ve srovnání s dosud používanými a známými postupy je možno shrnout následujícím způsobem.

Při souprůdné jedno- nebo dvoustupňové extrakci, běžně používané pro výrobu heparinových extraktů, jsou nezbytné programově řízené změny teplot, hodnot pH a dále je nezbytné najít vhodná extrakční chemická činidla. Protiproudá extrakce podle vynálezu je realizovatelná v témže zařízení

jednoduchým rozpuštěním výchozí suroviny, provedeném v daném systému v optimálně vybraném vodném alkalickém médiu, beze změn provozních podmínek a bez potřeby přidávání různých chemických látek.

Při protiproudé extrakci vznikají extrakty stálého složení, prakticky bez obsahu tuků, o pěti- až desetinásobně vyšší koncentraci aktivní látky než u běžně prováděných extrakcí. Postup podle uvedeného vynálezu proběhne během krátkého časového intervalu a s dostačujícím výtěžkem, přičemž poměr heparinu k vedlejším nežádoucím přídruženým látkám je u tohoto postupu mnohem příznivější než u běžně prováděných metod.

Protiproudá extrakce není závislá na chemických vlastnostech použitých chemických látek, ale provádí se pomocí nejvhodnějších a nejméně drahých chemických látek, které jsou k dispozici.

Požadavek na objemovou kapacitu zařízení pro protiproudou extrakci ve srovnání se zařízeními používanými při běžně známých postupech se snižuje na 1/4 až 1/10. Při této protiproudé extrakci se získá extrakt o konstantním složení, obsahující heparin koncentrovaný v malém objemu. Objemovou kapacitu zařízení je možno zmenšit a zvýšit tak stupeň její využitelnosti.

V případech, kdy je zapotřebí úplně oddělit heparin ze systému protiproudé extrakce a současně zmenšit objem, dostačuje použití dopravních čerpadel a vakuových bubnových filtrů. Kontinuální oddělování heparinu je možno v tomto případě realizovat přidáváním kvartérních amonných sloučenin a roztoku proteinu o známých vlastnostech a složení, přičemž poté se systém okyselí, načež se izoluje sraženina obsahující oddělený heparin.

Zmenšení objemu znamená významnou úsporu energie, snížení pracnosti a úsporu výdajů na chemické prostředky.

Shrnou-li se výhody postupu podle uvedeného vynálezu, je možno konstatovat, že tímto postupem podle vynálezu je možno připravit extrakty s mimořádně vysokým obsahem heparinu o stálém složení kontinuální protiproudou extrakcí, s krátkou provozní dobou, v malých objemech a na jednoduchém zařízení. Z těchto extraktů je možno účinně izolovat heparin farmaceutické kvality libovolným běžným způsobem.

Použije-li se k provádění postupu podle vynálezu U-extraktor popsáný v maďarském patentu č. 159 977 a extrakce se provede pomocí extrakčního roztoku o teplotě 50 °C, koncentraci 0,5 až 1,0 N, a obsahující minimálně 5 % chloridu sodného, přičemž doba zdržení v extraktoru je 30 minut, potom je možno z koncentráту živočišných orgánů, obsahujících heparin, úplně vyextrahovat tuto aktivní látku. Poměr sušiny koncentrátu ze živočišných orgánů k extrakční kapalině je 1 : 5.

Koncentrát z orgánu o velkém specifickém

povrchu při kontaktu s vodou mírně nabobtná, ale zachová si svůj granulární charakter a výborné filtrační vlastnosti i při vysoké alkalické koncentraci. Vzrůst alkalické koncentrace prakticky skoro neovlivňuje množství rozpuštěné neheparinové organické sušiny a množství rozpuštěných proteinů a peptidů se rovněž nemění. Příčinou toho je pravděpodobně podstatná a nevratná denaturace proteinů, zasahující hlavní část živočišného orgánu určeného k extrakci, ke které dochází během sušení.

Postup podle uvedeného vynálezu bude v dalším podrobně ilustrován v příkladech provedení. Některé srovnávací příklady jsou uvedeny za účelem porovnání výhod postupu podle vynálezu s dosavadními používanými postupy.

Příklad 1

Postup podle tohoto příkladu je postupem srovnávacím. Suchý, granulovaný, heparinový koncentrát získaný postupem podle patentu Velké Británie č. 2 045 272 byl extrahován běžným způsobem autolýzou v přítomnosti toluenu a za použití roztoku elektrolytu.

V tomto provedení bylo 20 kg granulovaného, heparinového koncentrátu intenzivně mícháno se 100 kg jemně rozemletých vepřových tenkých střev o obsahu 18 % sušiny, dále se 450 litry vody a 150 litry 10 % roztoku síranu amonného v duplikátoru s míchadlem. Po promíchání byla směs zahřáta na teplotu 38 °C. Po dosažení této teploty byla za stálého míchání upravena hodnota pH pomocí 40 % hydroxidu sodného. Za účelem zabránění nežádoucích mikrobiologických procesů byly do systému přidány ještě 3 litry toluenu.

Po přidání enzymů proběhla autolýza během 36 hodin, přičemž teplota byla udržována na 38 °C a systém se periodicky promíchal. Hodnota pH byla zjišťována každých 6 hodin a v případě potřeby byla stanovena hodnota pH udržována pomocí 40 % hydroxidu sodného.

Po 36hodinové autolýze byla hodnota pH upravena na 7,3 až 7,7 pomocí 18 % kyseliny chlorovodíkové a směs byla zahřáta k teplotě varu. Potom byla směs udržována za varu po dobu 10 minut, přičemž částice účinkem tepla zkoagulovaly a byly odstraněny pomocí síta. Filtrát byl oddělen od tuku při teplotě 60 °C. Tímto shora uvedeným postupem bylo získáno 638 litrů tmavě hnědé zabarvené kapaliny o koncentraci heparinu 18,1 m. j./ml, odpovídající 11,5 miliónům m. j. heparinu. Výtěžek srovnaný s dále uvedeným příkladem 5 byl pouze 76 %.

Příklad 2

Postup podle tohoto příkladu je postupem srovnávacím. Podle tohoto příkladu prove-

dení byl suchý, granulovaný, heparinový koncentrát uvedených charakteristik extrahován postupem uvedeným v příkladu 1 patentu Spojených států amerických 3 817 831. Při tomto postupu bylo 40 kg granulovaného heparinového koncentrátu pečlivě promícháno se 400 litry vody v duplikátoru s míchadlem, přičemž hodnota pH byla udržována na 2,7 kyselinou chlorovodíkovou a směs byla zahřata na teplotu 38 °C. Potom byl přidán do uvedené směsi pepsin, odpovídající 10 kg vepřové žaludeční mukózy, a hodnota pH byla upravena na původní hodnotu. Proteolýza probíhala po dobu 20 hodin za stálého míchání, přičemž teplota byla udržována na hodnotě v rozmezí od 37 do 39 °C.

Po proběhnutí proteolýzy, která trvala 20 hodin, byla hodnota pH upravena pomocí 40% hydroxidu sodného a teplota byla potom upravena na 37 °C, načež bylo přidáno 20 litrů směsi aktivovaného pankreatu. Druhá proteolýza probíhala po dobu 10 hodin, hodnota pH byla zjišťována každé dvě hodiny a v případě potřeby byla upravována pomocí hydroxidu sodného na hodnotu pH 8. Teplota byla udržována na 37 °C. Po proběhnutí druhé proteolýzy se směs zahřála k teplotě varu a potom byla přefiltrována přes síto. Tímto způsobem bylo získáno 417 litrů hnědavého filtrátu o koncentraci heparinu 32,0 m. j./ml, odpovídající 13,32 miliónu m. j. heparinu. Ve srovnání s dále uvedeným příkladem 5 činil výtěžek pouze 62,7 %.

Příklad 3

Postup podle tohoto příkladu je postupem srovnávacím. Suchý, granulovaný heparinový koncentrát byl zpracován způsobem uvedeným v maďarském patentu č. 148 776. Při tomto postupu bylo 11,2 kg granulovaného heparinového koncentrátu pečlivě promícháno se 195 litry vody v duplikátoru s míchadlem. Potom bylo přidáno 6,5 kg hydroxidu sodného a hodnota pH byla upravena na 10 pomocí 40% hydroxidu sodného. Za pravidelného míchání byla teplota směsi zvýšena pomocí páry na 65 °C a za této teploty byla uvedená směs zpracována peroxidem. K tomuto účelu bylo 250 mililitrů 40% peroxidu vodíku zředěno vodou na 4,1 litru, načež 1 litr takto zředěného roztoku byl přimíchán do směsi. Zbývající 3 litry byly postupně přidávány do systému pravidelnou rychlostí během 30 minut, přičemž byla stále udržována teplota 65 °C. Po zpracování směsi peroxidem se směs míchala po dobu 1 hodiny při teplotě 65 °C a potom se přidalo 600 gramů chloridu amonného, přičemž tato směs měla hodnotu pH 8,7. Potom se směs zahřála prostřednictvím pláště duplikátoru až k teplotě varu a na této teplotě byla udržována po dobu 5 minut, přičemž potom bylo zahřívání a míchání zastaveno.

Směs se během 15 minut nechala usadit a světle žlutá, zcela průsvitná kapalina nad zbytky extrahovaných živočišných orgánů, usazených na dně zařízení, se dekantovala pomocí drenážní výpustě, umístěné na boční stěně zařízení. Po dekantaci byla směs zbytků orgánů a vodného extraktu, vyplňující asi 1/4 zařízení, po promíchání vylita na síto o velikosti ok 0,8 mm. Objem spojených extraktů činil 168 litrů, koncentrace heparinu byla 32,4 m. j./ml, odpovídající výtěžku 5,44 miliónu m. j. heparinu. Výtěžek ve srovnání s dále uvedeným příkladem 5 byl pouze 72,4 %.

Příklad 4

Podle tohoto příkladu provedení bylo 5,0 kilogramů suchého, granulovaného heparinového koncentrátu o kvalitě specifikované v příkladu 1, rozděleno na 10 stejných dílů, přičemž takto získané 0,5 kg podíly byly zpracovány metodou přerušované protiproudé extrakce v pěti extrakčních stupních, přičemž objem extrakčních roztoků byl vždy 3,2 litru. Extrakční stupně probíhaly následujícím způsobem.

První podíl 0,5 kg suchého, granulovaného heparinového koncentrátu byl vložen do extrakční nádoby obsahující 3,2 litru směsi 0,25 N hydroxidu sodného obsahujícího 6 % hmotnostních chloridu sodného, o teplotě 40 °C. Směs byla míchána při teplotě 40 °C po dobu 20 minut. Po 20 minutách byl extrakt zfiltrován vakuovým způsobem na Büchnerově nálevce, přičemž jako filtračního prostředku bylo použito kovového sítky s velikostí ok 0,6 mm. Takto získaný první extrakční filtrát byl jímán, přičemž byla u něho zjišťována aktivita heparinu.

Podél mokrých živočišných orgánů, zachycený na sítu se opět smíchal při teplotě 40 °C s roztokem 0,25 N hydroxidu sodného obsahujícího 6 % hmotnostních chloridu sodného o celkovém množství 3,2 litru extrakčního objemu. Druhá extrakce již jednou extrahovaných orgánů proběhla jako předtím. Druhý extrakční filtrát již jednou extrahovaného podílu suché heparinové suroviny se smíchal s druhým 500gramovým podílem suchého heparinového koncentrátu a extrakční objem byl doplněn do 3,2 litru pomocí již uvedeného roztoku. Další stupně byly prováděny stejným způsobem přerušované protiproudé extrakce. Extrakční objem byl vždy 3,2 litru a teplota byla 40 °C.

Filtrát z posledního extrakčního stupně předchází vsázky granulovaného koncentrátu se vždy použije pro extrakci následující čerstvé vsázky suchého granulovaného koncentrátu. Takto získaný filtrát je v každém stupni oddělován jako část konečného extraktu.

Objemy a aktivita heparinu v jednotlivých získaných extrakčních roztocích je uvedena

souhrnně v následující tabulce. Pouze u desátého podílu jsou uvedeny výsledky jednotlivých stupňů extrakce, přičemž u ostat-

ních podílů jsou uvedeny pouze souhrnné výsledky.

Číslo podílu	Objem filtrátu (ml)	Aktivita heparinu (m. j./ml)	Obsah heparinu (milion m. j.)
I.	1770	83	0,147
II.	1810	118	0,214
III.	1790	133	0,238
IV.	1750	140	0,245
V.	1800	143	0,257
VI.	1770	153	0,271
VII.	1800	153	0,275
VIII.	1780	152	0,271
IX.	1815	149	0,270
X./1	1790	153	0,274
stupeň X./2	1800	52,5	0,095
stupeň X./3	1850	16,4	0,030
stupeň X./4	1830	5,2	0,009
stupeň X./5	1780	1,8	0,003
Celkem			2,599

Jak ukazuje tabulka, z 5 kg suchého, granulovaného heparinového koncentráту o obsahu 90,4 % sušiny bylo získáno 2,599 milionů m. j. heparinu za pomoci pětistupňové přerušované protiproudé extrakce. Z hodnot aktivit heparinu v každém extrakčním stupni u 10. podílu je možno udělat závěr, že tato extrakce proběhla exhaustivním způsobem. Výtěžek byl prakticky shodný s výtěžkem uvedeným v následujícím příkladu 5, to jest 98,3 %.

Příklad 5

Suchý, granulovaný heparinový koncentrát o stejné kvalitě jako v příkladu 1 byl podle tohoto příkladu provedení extrahován protiproudým způsobem v U-extraktoru uvedeném v maďarském patentu 159 977.

Při provádění tohoto postupu byl suchý, granulovaný heparinový koncentrát nepřetržitě přiváděn do extraktoru šnekovým dávkovačem. Rozprašovacími hlavicemi, umístěnými nad dávkovačem byl přiváděn roztok 0,55 N hydroxidu sodného, obsahující 6 % hmotnostních chloridu sodného, o teplotě 70 °C a o objemu rovnajícím se dvojnásobku množství přiváděné suroviny. Doba prodlení materiálu ve šnekovém dávkovači byla 10 minut. Objem extrakční kapaliny k objemu nabotnalého materiálu byl 5 : 1. V dalším postupu byl k nabotnalému materiálu přidáván roztok 6% chloridu sodného obsahující 0,1 N hydroxid sodný, přičemž toto zpracování bylo provedeno protiproudě vzhledem k postupu nabotnalého materiálu vedeného do komor U-extraktoru. Během kontinuální protiproudé extrakce pro-

bíhající v zařízení byla udržována teplota 50 °C. K usnadnění dopravy materiálu bylo použito vibrátoru, umístěného na dně U-extraktoru, pomocí kterého byl aplikován na materiál rázový posun.

Kontinuálně vznikající objem extrakční kapaliny, která měla světle hnědou barvu a byla téměř průhledná, byl měřen rotametrem a koncentrace heparinu byla stanovována u vzorků odebíraných každých 30 minut.

Obsah heparinu v kontinuálně vznikajícím extraktu v protiproudém extrakčním systému byl separován obvyklým způsobem, používaným při kontinuálním postupu, přičemž sraženina oddělená na bubnovém filtru byla určena k dalšímu zpracování.

Uvedený postup byl prováděn na zařízení s kapacitou 10 kg vysušené suroviny za hodinu, přičemž doba prodlení materiálu byla 35 minut.

Po desetihodinovém provozu měl heparin aktivitu v průměru 252 m. j./ml, vycházející ze vzorku odebraného z 210 litrů extraktu. To představuje výtěžek 52,9 milionu m. j., vztaženo na 100 kg suroviny o obsahu 90,4 % sušiny.

Při testování vlhkých zbytků granulovaného heparinového koncentrátu, odvedených z U-extraktoru za účelem zjištění aktivity heparinu, bylo shledáno, že protiproudá extrakce byla realizována s výtěžkem asi 98 procent.

Zbytky extrahovaného granulovaného heparinového koncentrátu je možno použít jako vynikajícího krmiva pro zvířata, přičemž tento materiál obsahuje vysokou koncentraci proteinů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy vodných extraktů stálého složení s nízkým obsahem tuků a dalších znečišťujících složek a s vysokým obsahem heparinu, přičemž se vychází ze suchého, amorfního koncentráту, který si zachovává svoji granulovanou formu, s hmotnostním obsahem sušiny v rozmezí od 90 do 95 % a s velkým specifickým povrchem, získaným z živočišných tkání obsahujících heparin tak, že se podrobí vodná suspenze rozřezaných živočišných tkání autolýze, přičemž po autolýze se suspenze tepelně zpracuje při teplotě v rozmezí od 75 do 100 °C

a takto získaný vysrážený komplex obsahující heparin se oddělí a oddělená sraženina se suší na obsah 90 až 95 % hmotnostních sušiny, vyznačující se tím, že tento suchý granulovaný koncentrát, obsahující heparin, se podrobí při teplotě v rozmezí od 20 do 80 °C kontinuální nebo přerušované protiproudé extrakci vodným roztokem chloridu sodného o koncentraci v rozmezí od 1,5 do 12 % hmotnostních, který se zalkalizuje hydroxidem sodným na hodnotu pH v rozmezí od 8 do 12,8.