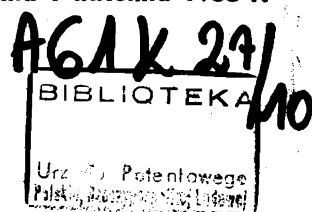


Opublikowano dnia 1 kwietnia 1958 r.



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 40842

Kl. 30 h, 2/04

Lubomir Urbanek

Praga, Czechosłowacja

Sposób wytwarzania preparatu protaminowego

Patent trwa od dnia 14 sierpnia 1956 r.

Pierwszeństwo: 1 września 1955 r. (Czechosłowacja)

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania preparatu protaminowego, który nadaje się do zastosowania przy zastrzykach dożylnych. Protaminy zdobywają coraz większe znaczenie w terapii i fizjologii eksperymentalnej jako środek, za pomocą którego można niweczyć antykoagulacyjne działanie heparyny.

Jedną z najważniejszych protamin jest klupeina, którą dotychczas stosowano w postaci siaraczanów.

Istnieją dwie metody otrzymywania klupeiny z mleczka śledzi: metody te dostarczają jako produkt końcowy albo siarczan klupeiny albo, też chlorowoderek estru metylowego klupeiny.

Do celów terapeutycznych i biologicznych dotychczas stosowano wyłącznie siarczan klupeiny.

Starsze metody otrzymywania klupeiny opierały się stale na klasycznej pracy A. Kossela (Ztschr. Physiol. Chem. 25, 165-1898). Protaminę wyodrębniano przy tym w postaci nierozpusz-

czalnego pikrynianu, który następnie przeprowadzano w chlorowoderek estru metylowego, albo w siarczan.

Nowsze metody R. Blocka i innych (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70, 494-1949), prowadzą również do siarczanu klupeiny jako produktu końcowego, przy czym podczas wyodrębniania klupeiny podstawowym produktem pośrednim jest metafosforan klupeiny.

Dawniejsze doświadczenia zostały z powodzeniem wykorzystane przez szereg autorów do otrzymywania preparatów o wysokiej czystości do badań nad chemiczną budową protaminy.

Nowsze badania Blocka zostały dostosowane i technologicznie opracowane do wytwarzania siarczanu klupeiny przy produkcji protaminy-cynko-insuliny.

Dalsze, wielokrotnie powtórzone próby, dowiodły jednak niezbicie, że żadna z tych metod nie nadaje się do wytwarzania preparatów pro-

taminowych do zastrzyków dożylnych. Powody tego są następujące:

Wszystkie zmodyfikowane sposoby oparte na metodzie Kossela stosują strącanie i oczyszczanie klupeiny w postaci pikrynianu.

Chociaż pikrynian poddaje się następnie rozkładowi i usuwa powstały kwas pikrynowy, resztki tego kwasu tkwią jednak uparcie w wydzielanej klupeinie i przechodzą do dalszych stadiów przeróbki i procesów oczyszczania.

Przygotowane w ten sposób preparaty, mogą być oczyszczone od kwasu pikrynowego wyłącznie przez ich powtórne strącenie, co znacznie obniża wydajność. Preparaty niedostatecznie oczyszczone nie nadają się do zastrzyków dożylnych, ponieważ nawet znikome ilości trującego kwasu pikrynowego zdradzają swoją obecność przez żółte zabarwienie oraz działanie trujące i wywołujące gorączkę.

Wprawdzie sposób Blocka unika również stosowania kwasu pikrynowego, daje on jednak, jako produkt końcowy siarczan klupeiny, który jest wystarczająco rozpuszczalny tylko w kwaśnych roztworach przy pH poniżej 4—5.

Ta właściwość siarczanu klupeiny jest sprzeczna z wymaganiami jakie się stawia preparatom do iniekcji, którego optymalne pH powinno wynosić około 7, a najniższe 6.

W czasie doświadczeń przy użyciu kwaśnych roztworów spostrzeżono u królików zaburzenia, które uniemożliwiają stosowanie zastrzyków dożylnych. Stwierdzono, że chlorowodorek estru metylowego klupeiny nadaje się lepiej od siarczanu klupeiny jako środek zobojętniający działanie antykoagulacyjne heparyny.

W porównaniu z siarczanem klupeiny, chlorowodorek estru metylowego klupeiny jest lepiej rozpuszczalny w roztworze fizjologicznym przy pH = 6—7 i jako roztwór do zastrzyków wykazuje większą trwałość. Również nie wykazuje on właściwości trujących i nie wywołuje gorączki.

Wynalazek polega na tym, że otrzymany w znany sposób metafosforan klupeiny, przeprowadza się bezpośrednio w chlorowodorek estru metylowego klupeiny, który wydziela się przez oziębienie z roztworu alkoholu metylowego, po czym otrzymany produkt suszy się, przetawia eterem dwuetylowym, rozpuszcza w wodzie, doprowadza do pH = 6 i sterylizuje w znany sposób. Przez to zostają usunięte wady starszych metod i za pomocą prostego sposobu

otrzymuje się z dużą wydajnością preparat, który bez dalszego oczyszczania nadaje się doskonale do zastrzyków dożylnych.

Według omawianego sposobu otrzymany znana metodą metafosforan klupeiny odwadnia się najpierw za pomocą bezwodnego metanolu.

Z wysuszonego w ten sposób metafosforanu i metanolu sporządza się zawiesinę, do której następnie wprowadza się strumień suchego chlorowodoru.

Mieszanie reakcyjną chłodzi się przy tym tak, aby jej temperatura nie przekroczyła 10°C.

Stosowanie kwasu pikrynowego jest całkowicie zbyteczne. Przez oziębienie mieszaniny reakcyjnej otrzymuje się chlorowodorek estru metylowego klupeiny prawie ilościowo i o takim stopniu czystości, że nieuniknione dawniej oczyszczanie staje się całkowicie zbędne. Przykład. Metafosforan klupeiny otrzymuje się w znany sposób ze świeżego albo mrożonego mleczka śledzi przez ekstrakcję rozcieńczonym kwasem octowym lub cytrynowym, następnie oddzielenie nukleoprotaminy na wirówce, rozłożenie jej słabym kwasem mineralnym, uwolnienie w środowisku alkalicznym od substancji obciążających i przeprowadzenie klupeiny w metafosforan.

100 g otrzymanego w ten sposób metafosforanu klupeiny odwadnia się przez parokrotne rozcieranie z absolutnym alkoholem metylowym.

Suchy preparat w postaci proszku rozprowadza się w kolbie w 2 litrach absolutnego metanolu. Kolba zaopatrzona jest w mieszadło i zamknięta jest rurką z chlorkiem wapniowym. Następnie w ciągu 2 godzin, przy silnym mieszanii i zewnętrznym chłodzeniu lodem, wprowadza się do kolby suchy chlorowódor, przy czym temperatura nie może przekroczyć 10°C.

W czasie przepuszczania chlorowodoru metafosforan klupeiny nie rozpuszcza się całkowicie, lecz stopniowo przechodzi do roztworu, przy czym z roztworu również stopniowo wytrąca się chlorowodorek estru metylowego klupeiny.

Następuje to dlatego, ponieważ stosunkowo ciężka cząsteczka metafosforanu przechodzi w bardzo drobną i lekką zawiesinę chlorowodoru klupeiny, który wypływa na powierzchnię.

Reakcja jest zakończona wtedy, kiedy cała ilość protaminy w fazie stałej ulegnie zmianom wyżej opisanym, a trwa to około 2 godzin.

Całkowite wydzielenie chlorowodorku estru metylowego klupeiny osiąga się po dwugodzinnym przebywaniu tego roztworu w lodówce w temperaturze 0° — 4°C . Wydzielony osad odsącza się i przemywa bezwodnym eterem, który następnie odpędza się w próżni.

Wydajność wynosi 95—98% w przeliczeniu na użyty metafosforan.

Otrzymany czysto biały preparat w postaci proszku rozpuszcza się w redestylowanej wodzie, kwaśny odczyn roztworu doprowadza za pomocą rozcieńczonego ługu sodowego do $\text{pH} = 6$ i sterylizuje przez ogrzewanie w autoklawie. Roztwór otrzymany w ten sposób może być użyty do zastrzyków dożylnych.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania preparatu protaminowego do zastrzyków dożylnych z soli klupeiny, znamienny tym, że otrzymany w znany sposób metafosforan klupeiny przeprowadza się bezpośrednio w chlorowodorek estru metylowego klupeiny, który wydziela się z roztworu metanolu przez oziębienie do temperatury powyżej 10°C , po czym otrzymany produkt suszy się, przemywa eterem dwuetylowym, rozpuszcza w wodzie, roztwór doprowadza do $\text{pH} = 6$ i w znany sposób sterylizuje.

Inż. Lubomir Urbanek

Zastępca: Kolegium Rzeczników Patentowych