

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
19



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

211 803

(11) (1)

(51) Int. Cl.³

C 08 B 37/10

A 61 K 31/725

(22) Přihlášeno 20 02 70
(21) PV 1176-70

(40) Nebylo zveřejněno

(45) Vydáno 31 10 83

(75)

Autor vynálezu

JIRÍČEK Vladimír, PhMr. RNDr., ŘEŘIČHA Stanislav, PhMr.,
VÁVRA Vladimír, Praha

(54) Způsob izolace heparinu

Vynález se týká způsobu izolace heparinu z upraveného proteolyzátu hovězích plic tak, že se v proteolyzátu rozpustí chlorid sodný v množství 1 až 2 % hmot., načež se po přidavku organického rozpouštědla těžšího než voda, například chloroformu nebo tetrachlorethylenu, směs zředí 2- až 3-násobným objemem vody, vyčistí, těžší fáze se oddělí a čirý roztok se zpracuje na heparin.

(54) Způsob izolace heparinu

1

Vynález se týká způsobu izolace heparinu z tekutých proteolyzátů, připravených enzymatickou degradací plic, zejména hovězích.

Heparin patří mezi kyselé mukopolysacharidy, které se ve velmi malých množstvích vyskytují v tkáních různých živočišných orgánů, např. plic, žaludeční nebo střevní sliznice atd., a které mají v organismu různé biologické funkce. Pro svoji vysokou antikoagulační a antilipemickou účinnost zaujímá heparin, nejznámější z uvedených mukopolysacharidů, významné místo v klinické praxi jako cenné léčivo. Je známo, že pojem heparin neoznačuje látku jednotného složení, kterou lze charakterizovat přesnými fyzikálně-chemickými konstantami, ale nehomogenní směs vyšších esterů kyseliny sírové, nejvýše však tetrasírového esteru (vztaheno na základní strukturní tetrasacharidovou jednotku). Vedle těchto vyšších esterů jsou v heparinu přítomny částečně i estery nižší. Směs těchto esterů je potom pod názvem heparin používána v klinické praxi jako konečná léková forma, podávaná nejčastěji parenterálně.

Izolace heparinu v průmyslovém měřítku spočívá ve zpracování výchozí suroviny, převážně hovězích plic, buď enzymatickou degradací (proteolýzou) tkáně nebo extrakcí tkáně roztoky anorganických solí, zejména chloridu sodného. V průběhu zpracování výchozí suroviny dochází v různém stupni k rozpuštění a suspendování průvodních látek (bílkovin a jejich degradačních produktů, tuků, zbytků apod.). Tyto balasty svým množstvím řádově několikanásobně převyšují množství heparinu obsaženého v roztoku. Vzhledem k tomu, že se v průmyslovém měřítku při výrobě heparinu zpracovávají velké objemy, představuje dokonalé vyčiření jedné násady značný technologický problém. Ve většině případů se dosud postupuje tak, že se výchozí roztok okyslí pod pH 3, za přítomnosti 10 % i více anorganických solí, obvykle chloridu sodného, čímž dochází k vysrážení bílkovin a jejich degradačních produktů. Vzhledem k přítomnosti většího množství elektrolytu zůstává heparin v roztoku. Po odstranění sraženiny balastů se potom heparin z čirého roztoku izoluje známými postupy, ať již srážením organickými, s vodou mísitelnými rozpouštědly nebo organickými aminky, nebo nověji srážením vyššími kvartérními amoniiovými solemi, s nimiž tvoří ve vodě nerozpustné komplexy [francouzský pat. spis č. 1 261 870, americký pat. spis č. 3 058 884, čs. pat. spis č. 118 820].

Nevýhodou popsaných způsobů čiření surových heparinových roztoků vylučováním a odstraňováním sraženiny balastů v kyselé oblasti pH je skutečnost, že dochází k ztrátě

2

tám heparinu, zejména jeho vysokoúčinné složky, částečnou adsorpcí na sraženinu balastů, a to i tehdy, je-li v roztoku přítomna sůl v koncentraci 10 % i více.

Bylo zjištěno, že k vyčiření roztoků surového heparinu, získaných proteolytickým štěpením nebo extrakcí plicní tkáně, není nutná úprava pH do kyselé oblasti, ale že je naopak výhodné čířit tyto roztoky v neutrálním nebo slabě alkalickém prostředí, kdy je heparin, přítomný v roztoku jako sodná sůl, dokonale rozpuštěn a nedochází k jeho adsorpci nebo jiné vazbě na odstraňované bílkovinné balasty. Přídavek chloridu sodného pro udržení účinného heparinu v roztoku je potom možno podstatně snížit, čímž se rovněž usnadňuje další zpracování vyčiřených roztoků. Takto lze vyčiřit extrakty nebo proteolyzáty bez nebezpečí ztrát na heparinu a z vyčiřených roztoků lze poté izolovat surový heparin některou ze známých metod nebo novým způsobem, pouhou adsorpcí na bílkovinný nosič, dodatečně vysrážený z vyčiřeného roztoku úpravou pH do kyselé oblasti.

Na základě nově zjištěných poznatků byl vypracován podle vynálezu způsob izolace heparinu z tekutých proteolyzátů, připravených enzymatickou degradací živočišných plic, zejména hovězích, upravených na hodnotu pH 7,0 až 8,5 a teplotu 40 až 60 °C, jehož podstata spočívá v tom, že se ve výchozím upraveném proteolyzátu nejprve rozpustí chlorid sodný v množství 1 až 2 %, načež se po přídavku organického, s vodou nemísitelného rozpouštědla, těžšího než voda, s výhodou halogenovaného alifatického uhlovodíku, jako chloroformu nebo tetrachlorethylenu, v množství 1 až 2 % obj., vztaheno na objem výchozího proteolyzátu, směs zředí 2- až 3-násobným objemem vody, vyčiří za současného oddělení těžší fáze a čirý roztok se dále zpracovává některým ze známých způsobů, např. okyselením, na surový heparin. Zpravidla se čirý roztok okyseluje na pH 2 až 3, s výhodou na 2,3 až 2,6, popřípadě se přidává 0,1 až 0,2 % vyšší kvartérní amoniiové soli, potom se vyloučená sraženina oddělí, rozpustí v 10 % roztoku chloridu sodného s hodnotou pH 8,0 až 9,0 při teplotě 70 až 80 °C a přídavkem ethanolu do koncentrace 60 % se vyloučí ve formě sraženiny surový heparin, který se po izolaci čistí obecně známým způsobem.

Za uvedených podmínek, tj. při úpravě pH na hodnotu 7,0 až 8,5 a při nízké koncentraci chloridu sodného zůstává heparin dokonale v roztoku a čiření, tj. odstraňování balastů a dispergování lipoidů probíhá v přítomnosti organického rozpouštědla, nemísitelného s vodou a těžšího než voda hladce a dokonale, bez ztrát účinné látky. Při dalším zpracování vyčiřeného roztoku

je adsorpce heparinu na přirozený bílkovinný nosič, vyloučený okyselením na pH 2 až 3, poměrně rychlá a asi během 1 hodiny dojde k naadsorbování prakticky veškerého heparinu z roztoku. V této fázi je možno k novému postupu připojit známý způsob izolace, který spočívá v přidavku vyšší kvartérní amoniové soli k suspenzi heparinu vázaného na bílkovinném nosiči, čímž lze z roztoku izolovat také nízkoúčinnou složku heparinu v jedné pracovní operaci. Po izolaci pevné fáze odstředěním nebo filtrací se izoluje naadsorbovaný heparin jejím rozpuštěním v alkalickém 10 % roztoku chloridu sodného a vysrážením ethanolom. Získaná sraženina se po izolaci čistí známým způsobem, např.: oxidací manganistanem draselným a frakcionací ethanolom, čímž se získá ve vysokém výtěžku heparin o účinnosti přes 100 m. j./mg.

Způsob podle vynálezu je objasněn dále v příkladu provedení:

K 1300 litrům proteolyzátu, získaného enzymatickým štěpením 800 kg hovězích plic, se přidá 40 kg chloridu sodného a po jeho rozpuštění se pH roztoku upraví na hodnotu 7,0 až 8,5. Do roztoku se potom za in-

tenzivního míchání a při teplotě kolem 60 °C přidá 15 litrů tetrachlorethylenu, rozpuštěného v 15 litrech ethanolu. Po důkladném promíchání se roztok zředí vodou na objem 4000 litrů a vyčistí se odstředěním. Vyčiřený roztok se okyselí kyselinou chlorovodíkovou na pH 2,0 až 3,0 s výhodou 2,3 až 2,6 a s vyloučenou sraženinou se míchá 1 hodinu. Poté se přidá 1 kg kvartérní amoniové soli (např. N-(karbethoxy-pentadecyl) trimethylamoniumbromidu) ve formě 10 % vodného roztoku, čímž se vysráží zbytek neadsorbovaných nízkoúčinných heparidů. Následujícím odstředěním se získá asi 20 kg sraženiny, která se rozpustí ve 200 litrech 10 % roztoku chloridu sodného při pH 8 až 9 a při teplotě 80 °C. Po dokonalém rozpuštění sraženiny se z roztoku vysráží surový heparin přidavkem ethanolu do koncentrace 60 %. Surový produkt se izoluje odstředěním a některým ze známých postupů zpracuje na čistý preparát. Získá se 150 až 180 g surového heparinu s účinností 80 až 100 m. j./mg a dále asi 2 kg nízkoúčinných podílů, které se zpracovávají dodatečnou sulfonací.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob izolace heparinu z tekutých proteolyzátů, připravených enzymatickou degradací živočišných plic, zejména hovězích, upravených na hodnotu pH 7,0 až 8,5 a teplotu 40 až 60 °C, vyznačující se tím, že se ve výchozím upraveném proteolyzátu nejprve rozpustí chlorid sodný v množství 1 až 2 %, načež se po přidavku organického, s vodou nemísitelného rozpouštědla, těžší-

ho než voda, s výhodou halogenovaného alifatického uhlovodíku, jako chloroformu nebo tetrachlorethylenu, v množství 1 až 2 % obj., vztaženo na objem výchozího proteolyzátu, směs zředí 2- až 3-násobným objemem vody, vyčistí za současného oddělení těžší fáze, a čirý roztok se dále zpracovává, např. okyselením, na surový heparin.