



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 80 03 21 (P. 222906)

Pierwszeństwo: 79 03 21 Węgry

Zgłoszenie ogłoszono: 81 01 02

Opis patentowy opublikowano: 1985 11 30



Int. Cl.⁸ A61K 31/725
C08B 37/10

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Richter Gedeon Vegyészeti Gyár RT, Budapeszt
(Węgry)

Sposób wytwarzania nowego typu surowca zawierającego heparynę

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowego typu surowca heparyny z narządów zwierzęcych, dzięki czemu uzyskuje się poważne udoskonalenie przemysłowego wytwarzania heparyny.

Heparyna jest ważnym lekiem ze względu na swoje własności przeciwkoagulacyjne. Syntetyczny sposób jej wytwarzania nie jest opanowany.

Surowcem do jej wytwarzania w skali przemysłowej są niezmiennie narządy zwierzęce bogate w heparynę, np. jelito cienkie świni, bydła, owiec, płuca. Narządy te, nawet stosunkowo bogate w heparynę, zawierając ją w nadzwyczaj małym stężeniu, rzędu 10^{-2} — 10^{-3} % wagowych. Wyodrębnienie tak małej ilości składnika aktywnego z ogromnej masy materiału stanowiącego balast samo w sobie stanowi poważny problem. Trudności te wzrastają dodatkowo na skutek zmian własności substancji towarzyszących heparynie, zachodzących pod wpływem rozkładu w trakcie magazynowania i transportu tego surowca.

Aby zapewnić ekonomiczną realizację wytwarzania heparyny w skali przemysłowej konieczne jest więc nie tylko oczywiste zachowanie całkowitej ilości heparyny w zgromadzonych narządach zwierzęcych do czasu ich przerobu, lecz także ważne jest, aby fizyczne, chemiczne i morfologiczne własności substancji towarzyszących, stanowiących główną część tych narządów, nie ulegały zmianom.

2

Jakiegokolwiek zmiany własności substancji towarzyszących mogą spowodować poważne kłopoty podczas przerobu a także stwarzać problemy przy oczyszczaniu w produkcji farmaceutycznej (ekstrakcja itd.), stawiając pod znakiem zapytania opłacalność wytwarzania gotowego produktu.

Z powyższych względów wskazane jest aby już na etapie przygotowywania surowca (gromadzenie i magazynowanie) były zapewnione odpowiednie warunki.

Ważność zagadnienia gromadzenia i magazynowania surowców zawierających heparynę omówiona została w nielicznych tylko opisach patentowych, np. w węgierskich opisach patentowych nr. 148 776 i nr. 149 329 oraz w opisie patentowym St. Zjedn. nr 2 587 924, lecz i one poruszają to zagadnienie mimochodem. Ważność odpowiedniego traktowania tego surowca już w etapie jego gromadzenia i magazynowania widoczna jest z poniższych ogólnie znanych faktów:

Żywe narządy będące w stanie równowagi fizjologicznej zawierają heparynę w różnych postaciach, głównie w postaci związanej z różnymi białkami. Po uboju zwierząt równowaga w ich narządach i tkankach zostaje naruszona i natychmiast rozpoczyna się autoliza, przede wszystkim działanie enzymów proteolitycznych żywych tkanek, powodując niekontrolowany rozpad substancji towarzyszących (stanowiących balast), a czasami i rozpad składnika aktywnego.

Z drugiej strony podczas gromadzenia i magazynowania narządów zwierzęcych, zwykle w warunkach niesterylnych, następuje zanieczyszczenie drobnoustrojami, w wyniku którego uwolnione zostają enzymy powodujące rozpad białka i składnika aktywnego. Efekt tego jest taki sam jak w poprzednim przypadku.

Opis patentowy St. Zjedn. nr 2884358 (kol. 1, w 51 do 53) wymienia nieprzyjemny zapach powstający w trakcie magazynowania narządów zwierzęcych, zmianę barwy zachodzącą nawet w produkcie końcowym, następowanie rozkładu termicznego i obniżenie ekstrakcji.

Ogólnie przyjęły się trzy sposoby gromadzenia i magazynowania narządów zawierających heparynę:

1) magazynowanie narządów w stanie naturalnym szybko i głęboko zamrożonych,

2) magazynowanie narządów po denaturacji cieplnej (gdzie denaturację poprzedza zwykle mielenie z doprowadzaniem wody), oraz

3) konserwowanie narządów zmielonych i rozcieńczonych wodą (w przypadku śluzówki bez mielenia, lecz po częściowym usunięciu wody z zawiesiny otrzymanej w wyniku płukania jelit) za pomocą chemikalii, zwykle różnych soli nieorganicznych.

Wadą sposobów wymienionych pod (1) i (2) jest to, że wymagają one dużych nakładów energetycznych, inwestycyjnych i pracy. Aby szybko uzyskać temperaturę -18°C i utrzymywać ją podczas magazynowania i transportu, dopóki nie rozpocznie się przerób, konieczne jest włożenie wysokich nakładów energii i inwestycji (musi być zapewniony bezpiecznie działający ciąg chłodniczy). Nakłady pracy wiążą się z operowaniem surowcem o bardzo dużej zawartości wody (77—85%), pakowaniem, transportem i przygotowaniem do przerobu (mielenie w stanie zamrożonym).

Trzeci sposób, czyli konserwowanie chemikaliami, jest niewątpliwie mniej energochłonny niż dwa poprzednie, lecz na skutek dużej zawartości wody w zgromadzonym surowcu (86—90%) wzrasta bardzo poważnie jego objętość i związane z tym koszty. Użycie chemikalii do konserwacji powoduje szybszą korozję przenośnika i urządzeń magazynowych, a konserwacja tych urządzeń, znajdujących się stale w ujemnych temperaturach, jest kłopotliwa i kosztowna.

Aby obniżyć koszty transportu i magazynowania dużych objętości rozcieńczonych roztworów (np. otrzymanych z płukania jelit), tylko część tego surowca zostaje wykorzystana (zawierająca stosunkowo dużo suchej masy). Aby to zrównoważyć, instaluje się urządzenia do gromadzenia tego surowca w wielu rzeźniach.

Wadą wszystkich trzech wymienionych sposobów jest fakt, że w czasie gromadzenia i magazynowania surowca można uzyskać warunki tylko zbliżone do bakteriostatycznych, w których tylko częściowo albo w ogóle nie zostaje wyłączone działanie enzymów.

Jakikolwiek błąd technologiczny (np. okresowa przerwa w ciągu chłodniczym, wyższa wyjściowa liczba bakterii, zanieczyszczenie itp.) może spowo-

dować utratę warunków prawie bakteriostatycznych, wzmożone i niekontrolowane działanie enzymów, prowadzące do znacznego zmniejszenia składnika aktywnego i zmiany składu surowca, a to oznacza kłopoty przerobowe i technologiczne.

Kłopoty związane ze zmianą składu (w wyniku rozpadu) wzrastają na skutek dużej zawartości naturalnego tłuszczu w narządach zwierzęcych.

Wady dotychczasowych sposobów gromadzenia surowca można by usunąć stosując takie rozwiązanie, w którym świeże narządy poddawano by przerobowi w sposób ciągły, w miejscu powstawania tego surowca, do heparyny lub półproduktu łatwego w magazynowaniu. Równie zadowalającym rozwiązaniem byłoby niezwłoczne suszenie świeżych narządów (odwodnienie rozpuszczalnikami i suszenie przez wymrażanie lub rozpylanie), magazynowanie tak otrzymanego stabilnego półproduktu w postaci proszku i poddanie go przerobowi w dogodnym czasie.

Jednakże takie rozwiązania możliwe są tylko w warunkach laboratoryjnych ze względów ekonomicznych (wysoki koszt związany z użyciem rozpuszczalnika lub wysokie koszty inwestycyjne i eksploatacyjne, por. *Methods of Biochemical Anal.* 24, 244 (1977), *ibid.*, 7, 269; *Methods of Carbon. Chem.*, 7, 90 (1976).

W oparciu o powyższe można stwierdzić, że pierwszy etap wytwarzania heparyny w skali przemysłowej, obejmujący gromadzenie narządów zawierających heparynę i magazynowanie ich przed właściwym przerobem, nie jest rozwiązany optymalnie, ponieważ skład tego surowca i zawartość w nim składnika aktywnego zmieniają się w szerokim zakresie.

Dotychczasowe znane sposoby wytwarzania heparyny w skali przemysłowej polegają na stosowaniu takich technologii ekstrakowania składnika aktywnego, które dawały by możliwość efektywnego przerobu narządów o najbardziej typowej, średniej jakości. Ponieważ jednak jakość stosowanych narządów jest zmienna, nie może być mowy o optymalnym wykorzystaniu tych sposobów.

Celem wynalazku jest umożliwienie wytwarzania heparyny z nowego typu surowca, w skali przemysłowej i systemem ciągłym, z optymalnym wykorzystaniem tego surowca, z usunięciem składników zbędnych zawartych w organach zwierzęcych (takich jak tłuszcz, sole nieorganiczne, polipeptydy, nukleotydy itp.).

Dzięki temu uzyskuje się surowiec o niespotykanym dotychczas nagromadzeniu składnika aktywnego. Poza tym tak otrzymany surowiec posiada stały skład pod względem chemicznym, fizycznym i morfologicznym. Przechowywany w warunkach pokojowych zachowuje stały skład przez czas nieograniczenie długi, bez potrzeby specjalnych warunków, w tym również liczbę drobnoustrojów, która jest bardzo mała w stosowanych warunkach.

Z tego nowego surowca można wytwarzać produkt końcowy — heparynę do celów leczniczych — dowolną znaną metodą ekstrakcyjną. Przy tym, dzięki temu, że użyty do tego suro-

wiec posiada stały skład, w tym dużą zawartość heparyny, małą ilość substancji towarzyszących i niewielką ilość tłuszczu, produkcję można zoptymalizować w znacznie wyższym stopniu. Nowy surowiec heparyny jest w postaci ziarna o określonej wielkości i znacznej powierzchni, jest bezpostaciowy i odporny nawet na wilgoć; wszystko to stwarza nowe dodatkowe korzyści w procesie wytwarzania heparyny na skalę przemysłową, zwłaszcza w etapie ekstrakcji (możliwość stosowania ekstrakcji przeciwprądowej).

Według wynalazku, sposób wytwarzania surowca heparyny, wzbogaconego w ten składnik aktywny, posiadającego stały skład, niską zawartość tłuszczu, małą liczbę drobnoustrojów, nie zmieniającego morfologii ani zawartości składnika aktywnego podczas magazynowania, poprzez gromadzenie narządów zwierzęcych i ich obróbkę, polega na tym, że narządy zwierzęce zawierające heparynę, w razie potrzeby po ich rozdrobnieniu, poddaje się obróbce wstępnej polegającej na ogrzewaniu w środowisku wodnym w temperaturze w zakresie 10–50°C przez 0,15–15 godzin, następnie z tak wstępnie obrobionej zawiesiny strąca się w temperaturze 75–100°C nierozpuszczalny w wodzie kompleks heparyny z białkiem, który poddaje się agregacji przez dalsze ogrzewanie w tej temperaturze, oddziela kłaczkowaty osad i suszy korzystnie w temperaturze poniżej 100°C do uzyskania ziarnistego produktu zawierającego 90–95% suchej substancji.

Wyściowym surowcem w sposobie według wynalazku jest korzystnie jelito cienkie, śluzówka, błona surowicza świni, płuca bydlęce, lecz można stosować i inne dowolne narządy zawierające heparynę, takie jak jelito cienkie bydląt lub owiec, śledzioną bydlęcą, inne trzewia takie jak wątroba itp.

Gdy stosuje się śluzówkę zbędne jest rozdrabnianie i rozcieńczanie wodą. Inne narządy zwierzęce tną się na kawałki 4–6 mm i przygotowuje się z nich zawiesinę wodną, w której białko i heparyna występują częściowo w postaci rozpuszczonej i częściowo w postaci koloidalnej. Zawiesinę przygotowuje się o zawartości 1,5–17% suchej masy. Do rozcieńczania zawiesiny stosuje się wodę korzystnie o temperaturze 36–42°C, dzięki czemu nie jest konieczne doprowadzanie ciepła z zewnątrz lub tylko w niewielkim stopniu, podczas obróbki tej zawiesiny.

Tak otrzymaną zawiesinę, z typowego surowca zawierającego heparynę obrabia się wstępnie korzystnie w temperaturze 30–50°C, na ogół przez 4 do 6 godzin. Po tej wstępnej obróbce przeprowadza się strącanie kompleksu heparyny z białkiem przez bezpośrednie przepuszczanie pary wodnej lub ogrzewanie w ciągu dłuższego czasu, gdy główna część zawartej heparyny jest w postaci związanej z białkiem dającym się odsączyć.

W systemie ciągłym i okresowym wstępnie obrobioną zawiesinę, ogrzaną do temperatury 75–100°C, utrzymuje w tej temperaturze przez 12–15 minut. Po strąceniu białka otrzymuje się wiel-

kość ziarna korzystną ze względu na oddzielenie przez sączenie. W tym czasie następuje również zniszczenie złośliwych drobnoustrojów. Osad, oddzielony w separatorze mechanicznym opartym na działaniu siły ciężkości, zawiera od około 20–25% suchej masy.

W separatorze takim w zamkniętym układzie winno się regenerować powierzchnię filtra w sposób ciągły. Można jednak stosować i filtry okresowe płaskie, filtry łukowe, wirówki lub separatory ogrzewane. Oddzielony przesącz odprowadza się do kanału. Przesącz ten może zawierać 5–35% wyjściowej suchej masy i jeśli wstępna obróbka była właściwie przeprowadzona, zawiera niepodlegające denaturacji cieplnej białko, peptydy, pochodne kwasów nukleinowych, tłuszcze, lipidy, sole mineralne. Oddzielony osad stanowiący koncentrat heparyny suszy się, korzystnie w temperaturze poniżej 100°C, do uzyskania zawartości 90–95% suchej masy.

Tak otrzymany koncentrat pozbawiony tłuszczu posiada bezpostaciowe cząstki o ziarnie, głównie w zakresie 0,2–1,6 mm, o dużej powierzchni, które można przechowywać przez długi okres czasu. Koncentrat ten nadaje się zwłaszcza do otrzymywania heparyny metodą ekstrakcji w przeciwprądzie, zarówno okresowym jak i ciągłym.

Stwierdzono, a także doświadczalnie zilustrowano to w przykładzie I, że wśród składników białkowych w świeżych narządach zawierających heparynę występują w dużym nadmiarze, w stosunku do heparyny obecnej w tych narządach w sposób naturalny, takie białka, które są zdolne wiązać rozpuszczoną heparynę i kompleksy heparyny z białkiem w taki sposób, że można je wyodrębnić z tego roztworu po typowej nieodwracalnej denaturacji cieplnej. Ilość tych białek zdolnych do wiązania heparyny maleje z postępem autolizy (rozkład), na skutek rozpadu tych białek na frakcje polipeptydowe, które nie ulegają denaturacji pod wpływem ciepła, a więc nie nadają się do takiego wiązania heparyny.

Poza tym stwierdzono, co zostało również zilustrowane w przykładzie II, że stosując kontrolowaną krótką autolizę, w narządach zwierzęcych zmniejsza się zawartość zarówno białek zdolnych wiązać heparynę jak i innych białek przez ich rozpad na fragmenty nie ulegające denaturacji pod działaniem ciepła. Dzięki temu uzyskuje się surowiec podstawowy bogatszy w heparynę w porównaniu z naturalnym wyściowym surowcem po denaturacji cieplnej.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń okazały się zadziwiające i nieoczekiwane, zgodnie z którymi szybkość rozpadu białek zdolnych wiązać heparynę jest wyraźnie mniejsza niż białek nie wykazujących tej zdolności, poza tym, że podczas autolizy możliwe jest również pozbywanie się w przesączu nukleotydów, nukleozydów itd. czyli składników towarzyszących, które przeszkadzają w produkcji.

W rezultacie tych stwierdzeń i ich wykorzystania otrzymuje się surowiec zawierający 20–25% suchej masy, wzbogacony w składnik aktywny, to jest w heparynę, praktycznie bez jej strat. Su-

rowiec ten w porównaniu z surowcem naturalnym zawiera o 5—35% w przeliczeniu o suchą masę, mniej składników towarzyszących przeszkadzających w późniejszej ekstrakcji heparyny.

Stwierdzono również, że nowy surowiec heparyny jest mniej wrażliwy na ciepło niż sama heparyna. Pozwala to na wyeliminowanie kosztownych i skomplikowanych metod suszenia, takich jak liofilizacja, suszenie rozpyłowe czy odwadnianie przy użyciu rozpuszczalników, gdyż związanie heparyny z białkiem w narzędzie zwierzęce ma takie działanie ochronne na heparynę, że umożliwia utrzymywanie tego narządu powyżej 100°C nawet przez kilka godzin.

Korzyści płynące z zastosowania sposobu według wynalazku można przedstawić w następujących punktach:

1. Otrzymuje się koncentrat heparyny o zawartości 90—95% suchej masy, który można przez długi czas magazynować w temperaturze pokojowej bez obawy zmiany zawartości składnika aktywnego czy zmiany składu.

2. Z produktu tego możliwa jest ekstrakcja heparyny z optymalną wydajnością przy przeliczaniu na jeden narząd.

3. Wymagane operacje podczas przerobu przeprowadza się w urządzeniach zajmujących małą przestrzeń, o niskich nakładach energetycznych i inwestycyjnych.

4. Koncentrat heparyny posiada małą liczbę drobnoustrojów, małą ilość lipidów i tłuszczu.

5. Nowy typ surowca posiada najkorzystniejszą postać i wielkość ziarna jeśli idzie o dalszy jego przerób, heparyna oddzielona w wyniku działania ciepła, związana z rodzinnym białkiem jest mobilna, to znaczy można ją ponownie rozpuścić.

6. Stały skład koncentratu daje możliwość upraszczania i optymalizacji technologii wytwarzania heparyny.

7. Transport nowego surowca nawet do odległych miejsc jest ekonomiczny.

8. Nakłady pracy w produkcji ciągłej są niskie.

Korzystne wykonanie sposobu według wynalazku polega na rozdrobnieniu narządu zwierzęcego (jeśli takie rozdrobnienie jest wskazane lub konieczne) w przemysłowym urządzeniu do mielenia mięsa na cząstki wielkości 4—6 mm., rozcieńczeniu wodą w temp. 18—50°C do uzyskania stężenia 1,5—17%. Tak otrzymaną zawiesinę wodną przepompowuje się do urządzenia służącego do przeprowadzania wstępnej autolizy, w którym jest utrzymywany przez 2—6 godzin w temp. 30—50°C. Po tej wstępnej obróbce zawiesinę poddaje się działaniu ciepła.

Do tego celu stosuje się wtryskiwacz pary wodnej. Następnie zawiesinę przepuszcza się systemem ciągłym przez sekcję izolowanych rur z małą szybkością przez 2 do 6 minut, otrzymując osad zawierający heparynę, który ma postać ziaren łatwych do odsączenia. Środowisko wodne, zawierające wyłącznie składniki zbędne, jest usuwane pod działaniem siły ciężkości, np. przez sitka i otrzymuje surowiec zawierający co najmniej 23% suchej masy. Odsączanie przeprowadza się w urzą-

dzeniu opisanym w węgierskim opisie zgłoszeniowym nr RI-705.

W urządzeniu tym zachodzi ciągła regeneracja powierzchni filtra, dzięki czemu uzyskuje się lepszą efektywność niż w systemie okresowym.

Oddzielony surowiec można magazynować bez chłodzenia i zamrażania, jeśli suszy się go w sposób ciągły w urządzeniu o wysokiej efektywności suszenia, opisanym w cytowanym węgierskim opisie zgłoszeniowym, z taką szybkością z jaką jest dostarczany. Podczas suszenia temperaturę powietrza i pary, a także wilgotnego powietrza opuszczającego urządzenie, reguluje się w taki sposób, aby w ciągu stosunkowo krótkiego czasu otrzymywać produkt o ziarnie 0,2—1,6 mm zawierający około 92% suchej masy, przy temperaturze powietrza na wlocie 80—180°C a na wylocie 50—110°C.

Otrzymany koncentrat pozbawiony jest enzymów, posiada stały skład, małą liczbę drobnoustrojów, nie zawiera tłuszczów, zachowuje niezmienny skład przez długi okres czasu, jego mała liczba drobnoustrojów sprawia, że nie następuje ich namnażanie, jest ekonomiczny pod względem magazynowania i transportu. Zawartość heparyny w koncentracie jest różna w zależności od zawartości heparyny w wyjściowym narzędziu zwierzęcym. Wychodząc ze śluzówki świni, uzyskuje się produkt 0,15 kg/10⁶NE składnika aktywnego o znacznie mniejszej ilości materiału balastowego w porównaniu z innymi podstawowymi surowcami heparyny.

Z tego koncentratu heparynę przeprowadza się w roztwór wodny, dowolną znaną metodą ekstrakcyjną, w znacznie korzystniejszych warunkach niż to ma miejsce z podstawowym surowcem stosowanym dotychczas. Powyższy sposób można także prowadzić systemem okresowym nie tracąc podstawowych korzyści.

Wynalazek ilustrują niżej przytoczone przykłady.

Przykład I. W przykładzie tym wykazano, że zawartość białek zdolnych wiązać heparynę w świeżym narzędziu zwierzęcym jest większa od zawartości heparyny.

1 kg świeżej śluzówki z jelita cienkiego świni, o zawartości suchej masy 16,0% wagowych, rozcieńczono 1,0 litrem wody. W wodzie tej uprzednio rozpuszczono sproszkowaną czystą heparynę w takiej ilości, aby jej stężenie wynosiło 82 NE/ml (NE — jednostka międzynarodowa). Zawiesinę ogrzewano do 85°C podczas mieszania a następnie, po 5 minutowym odstaniu, produkt zdenaturowany działaniem ciepła odsączono na sicie.

Z pobranej próbki z 1380 ml przesączu wyliczono, że stężenie heparyny wynosiło 1,4 NE/ml, to znaczy, że około 80000 NE z 82000 NE heparyny wprowadzonych do zawiesiny związało się ze zdenaturowanym narzędziem zwierzęcym.

Jeśli taką świeżą śluzówkę z jelita cienkiego świni (1 kg) utrzymuje się w warunkach pokojowych przez półtora dnia, rozcieńczy 1 litrem wody zawierającej 41 NE/ml heparyny, a na koniec przeprowadzi denaturację cieplną w 85°C, stężenie heparyny w przesączu 1440 ml wynosi 2,1

NE/ml, co oznacza, że zdolność zdenaturowanego narządu do związania heparyny na skutek autolizy w ciągu 1,5 dnia zmalała do 38000 NE.

Przykład II. Wykazano w tym przykładzie, że przez usunięcie substancji balastowych z narządów zwierzęcych otrzymuje się surowiec o nie-spotykanym dotąd nagromadzeniu heparyny, bez jej strat, pod warunkiem, że szybkość rozpadu części składowych obojętnych ze względu na wiązanie heparyny w czasie wstępnej autolizy jest mniejsza niż szybkość rozpadu białek zdolnych wiązać heparynę.

Trzy próby, każda po 2 kg świeżego jelita cienkiego świń, zawierającego 17,3% wagowych suchej masy, rozcieńczono 3 litrami wody. Temperatura obróbki wynosiła 29,5°C. Pierwszą próbę poddano obróbce bez autolizy, drugą po sześciu godzinach autolizy a trzecią po 18 godzinach autolizy. Obróbka polegała na ogrzewaniu zawiesiny narządu do 93°C podczas mieszania, odstawieniu na 5 minut i odsączeniu. Oznaczono wagę i zawartość suchej masy zdenaturowanego narządu zatrzymanego na sicie, a także objętość odrzuconego przesączu, zawartą w nim suchą masę i stężenie heparyny.

Z 2 kg świeżego jelita cienkiego świń nie poddanego autolizie otrzymano 1,37 kg zdenaturowanego narządu o zawartości 22,8% suchej masy; objętość przesączu wynosiła 3670 ml, zawartość suchej masy 0,82% wag., stężenie heparyny poniżej 1,25 NE/ml.

Po 6-godzinnej autolizie waga zdenaturowanego narządu wynosiła 1,18 kg przy zawartości suchej masy 23,2%; objętość przesączu 3780 ml, zawart. suchej masy 1,72%, stężenie heparyny 1,25 NE/ml. Ze śluzówki 2 kg świeżego jelita cienkiego świń, po 18 godzinach autolizy, otrzymano 0,99 kg zdenaturowanego narządu z zawartością suchej masy 24,1%; objętość przesączu wynosiła 3980 ml, zawartość suchej masy 2,43%, stężenie heparyny poniżej 1,25 NE/ml.

Ponieważ podczas obróbki nie było strat heparyny, jej zawartość w wyjściowym narządzie wynosiła 118000 NE i po kolejnych obróbkach jej zawartość odpowiednio wzrastała. Wyniki przedstawia tablica 1.

Przykład III. Wykazano w tym przykładzie, że po denaturacji śluzówki z jelita cienkiego świń w systemie ciągłym suszy się ją bez strat.

Zgromadzono w stanie zhomogenizowanym 260 kg wilgotnej śluzówki z jelita cienkiego świń, o zawartości 6,4% suchej masy, pochodzącej z urządzenia do płukania jelit. Pobrano z tej ilości 10 kg do dalszych badań (próba A), a resztę przez krótki czas ogrzewano do 85°C, podczas mieszania, w urządzeniu odpowiednim do bezpośredniego wprowadzania pary wodnej.

Podczas zbliżania się do temp. 85°C mieszanie zwalniano a po osiągnięciu tej temperatury przerywano je i pozostawiono na czas 15 minut, po którym proces denaturacji był zakończony. Skoagulowany produkt przeniesiono na metalowe sita o oczkach 1,2 mm i odsączono żółtawę ziarną zawierającą heparynę. Produkt ten pozostawiono na

Tablica 1

Surowiec wyjściowy i obróbka	Waga wilgotnego narządu g	Zawartość suchej masy %	Całkowita zawartość suchej masy, g	Całkowita zawart. heparyny, NE	Zawartość heparyny NE w 1 g suchej masy
jelito nie obrabiane	12000	17,3	346	118 000	342
jelito de- naturowane	1370	22,8	312	118 000	380
jelito po 6 godz. auto- lizy i dena- turowane	1180	23,2	274	118 000	434
jelito po 18 godz. auto- lizy- i de- naturowane	990	24,1	238	118 000	500

1 godzinę i sporadycznie mieszano w celu przyspieszenia suszenia. Otrzymano 62 kg skoagulowanego produktu zawierającego stosunkowo mniej tłuszczu niż w surowcu wyjściowym, jakkolwiek część tego tłuszczu została zatrzymana na dużej powierzchni ziaren podczas sączenia. Zawartość suchej masy w tym produkcie wynosiła 23,4%. W przesączu stwierdzono zawartość heparyny poniżej 0,9 NE/ml a suchej masy 0,88%. Pod względem składu przesącz ten zawierał tłuszcz, nierozpuszczalne i rozpuszczalne białko, trochę peptydów i polipeptydów, sole nieorganiczne i inne balastowe składniki.

Pobrano próby B, C, D każda w ilości 10 kg, ze zdenaturowanego produktu.

Próbę B sprasowano w prasie filtracyjnej do grubości warstwy 1,5 cm. W wyniku otrzymano 7,4 kg produktu zawierającego 30,3% suchej masy. Przy większej grubości warstwy efekt sprasowania jest gorszy.

Próbę C podzielono na dwie równe części otrzymując próby C₁ i C₂. Próbę C₁ o grubości warstwy 0,5 cm wysuszono w eksykatorze w 90°C w ciągu 1,5 dnia. Otrzymano 1,31 kg produktu o zawartości 88% suchej masy, który następnie rozdrobiniono w młynie i oznaczono jako próbę C₁₁. Drugą część próby C pozostawiono bez suszenia oznaczając ją jako próbą C₂.

Przeprowadzono równoległe doświadczenia ekstrakcji heparyny z prób A, C₂ i C₁₁. W celu możliwości porównywania wyników użyto do obróbki próby w takich ilościach, aby zawartość suchej masy w każdej próbie wynosiła 468 g. Tak więc ilości te wynosiły odpowiednio: 7,31 kg próby A, 2,0 kg próby C₂ i 5,32 kg próby C₁₁.

By móc porównywać wyniki ekstrakcji, użyto jednakowe stężenia suchej masy i proporcje reagentów. Objętość mieszaniny do ekstrakcji roz-

cieńczono wodą do 8,0 litrów. Do tego celu należało użyć wody z kranu: 690 ml w przypadku próby A, 6000 ml w przypadku próby C₂ i 7470 ml w przypadku próby C₁₁.

A oto dalsze czynności związane z ekstrakcją:

Do wodnej mieszaniny poddawanej ekstrakcji dodano podczas mieszania 385 g siarczanu amonowego i ogrzewano do 60°C. Po osiągnięciu tej temperatury dodano wodorotlenku sodu do uzyskania pH 10,0 i utrzymywano dalej w tej temperaturze przez 2,5 godziny do osiągnięcia stanu równowagi ekstrakcyjnej. Po tym czasie obniżono pH, podczas mieszania, do wartości 8,2 stosując do tego stały chlorek amonu, po czym ogrzewano do stanu wrzenia, który utrzymywano przez 5 minut.

Następnie mieszaninę pozostawiono w spokoju na 10 minut po czym pozostałość odsączono na sicie metalowym o oczkach 1,0 mm od cieczy. Z pozostałości tej pobrano próbkę i oznaczono zawartość suchej masy w celu określenia ilości cieczy zatrzymanej w tej pozostałości. Wydałości, wyliczone w oparciu o zawartość heparyny, znalezionej w próbach i wagę wyjściowego surowca, były następujące:

Próba A

Zawartość heparyny — 126 000 NE

proporcja surowca — 58,2 kg narządu/MNE

(MNE = milion jednostek międzynarodowych)

Próba C₂

Zawartość heparyny — 148 000 NE

proporcja surowcowa — 13,5 kg narządu/MNE

Próba C₁₁

Zawartość heparyny — 162 000 NE

proporcja surowcowa — 3,27 kg narządu/MNE

Analizę porównawczą tych wyników przedstawiono w tablicy 2 (znajdującej się na końcu).

Przykład IV. Służówkę z jelita cienkiego świń o średniej zawartości suchej masy 6,3%, pochodzącą (podobnie jak w przykładzie III) z urządzenia do płukania jelit, przepompowywano przez sekcję izolowanych rur, gdzie pozostawała przez 1,5 godziny w temperaturze 41°C.

Po tej autolizie mieszaninę poddano obróbce systemem ciągłym w urządzeniu w którego podgrzewaczu mieszanina zostaje ogrzana do 90°C przez bezpośrednie doprowadzenie pary, a następnie łagodnie przepływa przez 7,5 minuty przez sekcję izolowanych rur należącą do tego urządzenia. Skoagulowane ziarna oddzielone w filtrze bębnowym, zapewniającym filtrację ciągłą. Odsączony produkt jest przesyłany do suszarki połączonej z filtrami, ogrzewanej zewnętrznie parą, a wewnątrz gorącym powietrzem, zaopatrzonej w mieszadło i rolki. Gorące powietrze do tej suszarki, w której odbywa się suszenie ciągłe, doprowadza się z oddzielnego zespołu, w którym powietrze jest zasysane z otoczenia przez wentylator i ogrzewane parą do 142°C. Temperatura powietrza wilgotnego opuszczającego suszarkę wynosi 82—88°C.

Wyjściowy surowiec doprowadzany z szybkością 600 litrów na godzinę i po 6 godzinach prowadzenia procesu w tym urządzeniu otrzymano 178 kg

produktu prawie pozbawionego tłuszczu, o zawartości 90,4% suchej masy i liczbie drobnoustrojów 10²—10³ pc/g. Rozkład wielkości ziarna jest taki, że produkt można magazynować w stanie nienaruszonym w warunkach pokojowych przez czas nieograniczony: 80% tego produktu miała ziarno w zakresie 1,6—0,2 mm.

W czasie procesu pobierano próbki co pół godziny w celu oznaczenia zawartości suchej masy, heparyny i innych ważnych składników. Średnia zawartość suchej masy wynosiła 1,41%, stężenie heparyny poniżej 0,92 NE/ml, przesącz zawierał znaczne ilości tłuszczu, mniej niż w przykładzie I białek rozpuszczonych i nierozpuszczonych za to więcej peptydów i polipeptydów, a także sole nieorganiczne i inne obojętne zanieczyszczenia.

Produkt otrzymany w wyniku autolizy umożliwia wytworzenie podstawowego surowca wzbogaconego w heparynę. Suchym produktem w tym przykładzie była próba E poddana obróbce ekstrakcyjnej w ilościach i proporcjach jak opisano w przykładzie III.

Skład prób z przykładów III i IV oraz wyniki doświadczeń zestawiono w tablicy 2.

Dla celów dokładnego porównania wyliczono dwa typy zawartości heparyny i trzy typy proporcji surowcowych. Wyliczenie dwóch typów zawartości heparyny jest konieczne z tego względu, że stosowano pojedynczą ekstrakcję okresową, w której pozostałości zatrzymane na sicie w różnych ilościach podczas rozdzielania cieczy ekstrakcyjnych, przy założeniu równowagi, zawierały ciecz ekstrakcyjną o identycznym stężeniu jak ciecz po przesączeniu. Należy zauważyć, że tę zawartość heparyny teoretycznie uzyskuje się powtarzając ekstrakcję.

Wartość podana w kolumnie 9 jest wartością aktualnie uzyskaną przez wyliczenie w oparciu o wartości przesączonych cieczy ekstrakcyjnych, podczas gdy tak zwana wartość teoretyczna podana w kolumnie 13 oznacza teoretycznie osiągalną zawartość heparyny wyliczoną przy wzięciu pod uwagę zawartości cieczy ekstrakcyjnej w pozostałości.

Zawartość cieczy ekstrakcyjnej w pozostałości podaje kolumna 12. W oparciu o te wartości można stwierdzić, że im większa zawartość suchej masy surowca poddawanego obróbce, tym mniejsza pozostałość po ekstrakcji, to znaczy, że ekstrakcję można przeprowadzić efektywniej stosując podstawowy surowiec o większej zawartości suchej masy, nawet w przypadku ekstrakcji wielokrotnych. Wartości przedstawiające proporcje materiałowe, podane w kolumnie 10, były wyliczone w oparciu o aktualną wagę podaną w kolumnie 6 i zawartość heparyny z kolumny 9. Wartości w kolumnie 11 oznaczają dane w odniesieniu do 100% zawartości suchej masy (kolumna 6). Wartości tak zwanej proporcji surowcowej w kolumnie 11 odpowiadają wartościom odniesionym do 100% suchej masy z kolumny 6 w oparciu o teoretyczną zawartość heparyny (kol. 13). W oparciu o dane kolumny 6 i 13 można porównać zawartość heparyny w produkcie poddawany eks-

Tablica 2

Próba	Suro-wiec	Wstę-pna auto-liza	Sucha masa %	Poddano obróbce		Ciecz ekstrakcyjna			Proporcja surowcowa		Za-wart. cieczy ekstr. w pozost. ml	Teoretyczna	
				waga kg	sucha masa g	Obj. ml	stęż. hep. NE/ /ml	zawart. heparyny NE	dla wys. wagi kg/ /MNE	dla 100% narz. kg/ /MNE		zawart. heparyny NE	prop. su-row. dla 100% kg/ /MNE
A	suro-wa ślu-zówka	—	6,4	7,31	468	6120	20,6	126000	58,2	3,72	1740	162000	2,89
C ₂	sucha dena-turo-wana śluz.	—	23,4	2,0	468	6000	22,5	148000	13,5	3,16	1340	179500	2,62
C ₁₁	sucha dena-turo-wana śluz.		88,00	0,532	468	7030	23,1	162500	3,27	2,88	860	182000	2,57
E	sucha dena-turo-wana śluz.		90,4	0,518	468	7120	28,6	204000	2,54	2,29	900	229000	2,04

trakcji uzyskaną z przeprowadzaniem autolizy i bez.

Z danych zawartych w tablicy 2 wynika, że wartość proporcji surowcowej produktu po denaturacji i wysuszeniu jest prawie taka sama w produktach obrabianych bez autolizy i w porównaniu ze śluzówką z jelita cienkiego świni jest około 10% korzystniejsza. Podczas denaturacji możliwe jest usunięcie w przesączu wielu substancji balastowych. W przypadku wstępnej autolizy zawartość heparyny jest znacznie wyższa, około 30%, w porównaniu ze świeżym narządem.

Dane zawarte w obydwu tablicach doprowadzają do wniosku, że zdecydowanie wyższą zawartość heparyny uzyskuje się w produkcie po denaturacji i wysuszeniu, jeśli surowiec był poddawany autolizie. Doświadczenia porównawcze potwierdzają, że suszenie produktu nie powoduje pogorszenia heparyny.

Z nowego typu surowca można wytwarzać, np. na drodze typowej ekstrakcji, taki produkt, z którego otrzymuje się heparynę o jakości farmakologicznej.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowego typu surowca zawierającego heparynę, poprzez gromadzenie i obróbkę narządów zwierzęcych, **znamienny tym**, że narządy zwierzęce zawierające heparynę, ewentualnie po ich rozdrobnieniu, poddaje się obróbkę

35 wstępnej polegającej na ogrzewaniu ich w środowisku wodnym w temperaturze w zakresie 10—50°C przez czas 0,5—15 godzin, następnie z tak wstępnie obrobionej zawiesiny strąca się w temperaturze 75—100°C nierozpuszczalny w wodzie 40 kompleks heparyny z białkiem, który poddaje się agregacji przez dalsze ogrzewanie w tej temperaturze, oddziela kłaczkowaty osad i suszy, korzystnie w temperaturze poniżej 100°C, do uzyskania 45 ziarnistego trwałego produktu o zawartości 90—95% suchej masy.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się narządy zwierzęce rozdrobnione na cząstki 4—6 mm.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że 50 stosuje się zawiesinę wodną narządów zwierzęcych o zawartości 1,5—17% suchej masy.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że 55 rozdrobnione narządy zwierzęce rozcieńcza się wodą o temperaturze 36—42°C.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że obróbkę wstępną prowadzi się w temperaturze 30—50°C przez 4—6 godzin.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że 60 w systemie ciągłym i okresowym wstępnie obrobioną zawiesinę ogrzaną do temperatury 75—100°C utrzymuje w tej samej temperaturze przez 12—15 minut.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że 65 wykonywany jest systemem okresowym.