(19)**TJ** (11)**54**

Республика Таджикистан (51) **5 А 61 К 35/39**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

(12) Описание изобретения

К ПАТЕНТУ

(60) 1644712 SU, 29.12.83
(21) 94000167
(22) 29.12.94
(31) P 3248587.5; P 3248588.3
(32) 30.12.82
(33) DE
(46) 26.11.96, Бюл.№ 3
(53) 615.45 (088.8)
(71) Нордмарк-Верке ГмбХ (DE)
(72) Ханс Шультце (DE)
(73) Нордмарк- Верке ГмбХ (DE)
(56) Патент США № 3223594, кл. 195-68, 1965.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПАНКРЕАТИНА ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(57) Изобретение относится к медицине, в частности к способу получения лекарственных средств. Цель изобретения - повышение выхода целевого продукта с более высокой активностью. Для этого замороженные свиные поджелудочные железы размельчают, пропуская через мясорубку,и проводят аутолиз при температуре (-2) - (+30)°С и рН 6,5-8,5. Параллейно через каждые 15 мин. анализируют пробу на осаждение в 55-65%-ном водном изопропиловом спирте. При наличии скорости осаждения аутолиза 3-10 мм в течение 1-3 мин прекращают аутолиз путем добавления изопропилового спирта до конечной концентрации 30-35%, затем проводят фильтрование через сито. В полученный раствор добавляют изопропиловый спирт в конечной концентрации 55-65% при 20-24° С. Полученный осадок промывают изопропиловым спиртом концентрацией 75-95%. Суспензию фильтруют на нуч-фильтре диаметром 40 см и отсасывают для просушивания в ваккуме при 55°С и давлении 5 мбар. Способ позволяет повысить выход целевого продукта с более высокой активностью. 4 табл.

Изобретение относится к медицине, в частности к способам получения лекарственных средств.

Целью изобретения является повышение выхода целевого продукта с более высокой активностью.

П р и м е р 1. 100 кг замороженных при низкой температуре свиных поджелудочных желез, пропущенных через волк-машину или через мясорубку, перемешивают в 250-литровом реакторе с раствором 100 г глюконата кальция в 20 л воды совместно с 200 г силиконового препарата, препятствующего пенообразованию. В зависимости от содержания трипсина в железах добавляют в качестве средства, способствующего началу процесса, от 1 кг готового панкреатина, растворенного в 5 л воды. Это количество панкреатина устанавливают посредством “37^0 пробы на гидролиз”. С этой целью отбирают из загруженной партии 120 г исходного материала.

После добавления 15 л 84%-ного изопропилового спирта замешивают раствор 1,3 кг бикарбоната натрия в 20 л воды. Оставляют стоять на ночь причем температура возрастает примерно от 2 до 12^0С, на следующее утро подогревают до 20^0С и продолжают перемешивание при этой температуре.

Момент окончания аутолиза распознают пробой на осаждение. С этой целью во время последнего периода аутолиза сначала каждые полчаса, затем через каждые 15 мин. отбирают 10 г суспензии, перемешивают 1 мин. с 5,4 сл 84%-ного изопропилового спирта с помощью стеклянной палочки, образовавшийся раствор отделяют от волокон, приставших к стеклянной палочке и замешивают в 20 мл содержащегося в стакане на 50 мл, снабженном магнитной мешалкой, 84%-ного водного раствора изопропилового спирта. Через минуту останавливают мешалку и оставляют для осаждения примерно 3 мин.

Если проба положительна, аутолиз (наличие более или менее прозрачного слоя высотой 3 мм через 1 мин. или 10 мм через 3 мин.) заканчивают.

В качестве примера воспроизводится характерная серия испытаний на осаждение, которые применяли, как только температура автолиза достигала 20^0С.

Данные испытания на осаждение приведены в табл. 1.

Из этого примера видно, что наиболее благоприятный момент времени для окончания аутолиза наступает через 3 ч. Для того, чтобы получить возможность достижения сравнимых соотношений при применении неизвестных (например, сохранявшихся более короткое или более продолжительное время) препаратов свиных поджелудочных желез, проводится “37^0 проба на гидролиз”. Из кашицеобразной массы желез, смешанных с глюконатом кальция, отбирают 120 г, смешивают с 1,5 г бикарбоната натрия в 25 мл воды и перемешивают 30 мин. при 37^0С. С пробой этого ускоренного аутолизата проводят испытание на осаждение. К основной массе загруженного материала добавляют свободный трипсин (в форме панкреатина) в следующих количествах: менее чем при 2 мм/3 мин - 2 млн. Е, при значении до 12 мм/1 мин - 1 млн. Е, а при еще большей скорости осаждения свободный трипсин не добавляют (1 млн. единиц свободного трипсина содержится, например, в 250 г поджелудочной железы с 4000 единицами в 1 г). Таким путем возможно стандартизировать для практических производственных условий сырьевой исходный материал различного происхождения.

После определения наиболее благоприятного момента времени аутолиз загруженной партии заканчивают посредством подачи насосом 72,5 л 84%-ного (регенерированного) изопропилового спирта. Перемешивают 1/2 ч, причем образуется прозрачный раствор, содержащий нерастворимые волокна, которые отделяют отсеиванием. Для этого содержимое реактора спускают в открытый котел на 50 л с заложенным ситом, имеющим ячейки около 5 мм. Котел снабжен якорной мешалкой. Сточный патрубок котла, снабженного ситом, соединяют посредством насоса с 500-литровой емкостью из полипропилена. В эту емкость загружают 318 л 84%-ного изопропилового спирта, туда же теперь добавляют при медленном перемешивании спускаемый раствор, пропущенный через сито. Волокна, оставшиеся в котле на сите, перемешивают еще 10 мин, причем волокна становятся относительно сухими. Вес волокон составляет 7-8 кг.

В 500 литровый резервуар помещают панкреатин в виде грубого осадка в течение 1 ч на объем 80 л (при 20^0С; при 24^0С в течение 1/2 ч. Отстоявшуюся жидкость спускают сифоном и направляют для регенерации на перегонку. Массу, оставшуюся на днище, перемешивают с 63 л регенерированного 84%-ного изопропилового спирта и оставляют еще на ночь для дополнительного осаждения. На следующий день этот процесс повторяют, смешивают полученный таким путем осадок на днище примерно с 54 л 84%-ного изопропилового спирта, т.е. с настолько большим количеством, чем необходимо для приготовления суспензии панкреатина в 84%-ном изопропиловом спирте. Эту суспензию фильтруют на нуч-фильтре диаметром 40 см и отсасывают до хорошего просушивания.

Плотную массу, отжатую на фильтре, быстро измельчают на резательной машине и распределяют на металлическом листе. Высушивают всю ночь при температуре обогрева до 55^0С при вакууме приблизительно 5 мбар.

Выход панкреатина, кг 11,6
Активность амилазы, FiP=E/мг 93,6
Активность липазы, FiP=E/мг 90,3
Активность протеазы, FiP=E/мг:
активированной энтерокиназой 5,6
без активирования 5,6
Активность трипсина, FiP=E/мг:
активированного энтерокиназой 4,2
без активирования 4,1
Активность химотрипсина, FiP=E/мг:
активированного энтерокиназой 28,3
без активирования 28,3
Содержание сухого вещества, % 98,7
Содержание жира, % 0,4
Плотность насыпная, г/мл 0,65
Плотность, г/мл 0,76
Число микроорганизмов, на 1 г 200

Нежелательные микроорганизмы по Фармакопии США 17-го издания (USP XVII) отсутствуют.

П р и м е р 2-4. Поступают аналогично примеру 1, изменяя условия проведения способа (pH, содержание изопропанола, температуру при аутолизе или содержание изопропанола при прерывании или температуру и содержание изопропанола при осаждении/промывании). Разницы в выходе по панкреатину не наблюдается, если испытание на осаждение варьировать в каждом случае в пределах диапазона от 3 до 10 мм/мин. Эти условия были испытаны для каждого примера в отдельности.

Результаты испытаний приведены в табл. 2.

П р и м е р 5. Поступают аналогично примеру 1, но без добавки изопропанола. Конца аутолиза достигают через 2,5 ч. Активность амилазы 83% при нагрузочной потере 5% и активность липазы 80% при нагрузочной потере 15%.

П р и м е р 6. Поступают аналогично примеру 1, добавляя 5 л пропанола. Конца аутолиза при этом достигают через 2,75 ч. Активность амилазы 88% при нагрузочной потере около 5!, а липазы 88% при нагрузочной потере 10%.

П р и м е р 7. Поступают аналогично примеру 1, но добавляют 10 л изопропанола. Конца аутолиза достигают через 3 ч. активность амилазы 93% (нагрузочная потеря 5%) и липазы 88% (нагрузочная потеря 8%).

П р и м е р 8. Если поступить аналогично примеру 1 и повысить температуру до 25^0C, а потом прервать реакцию, то достигнутые результаты будут те же, что и при температуре 15^0C.

П р и м е р 9-12. аутолиз и осаждение смеси энзимов из водного аутолиза осуществляют, как описано в примере 1. Чтобы определить влияние концентрации изопропилового спирта на процесс промывания, к пробам суспензии панкреатина добавляют изопропиловый спирт разной концентрации. Применяют по 1 л осадка, полученного в результате сливания сифоном отстоявшегося верхнего слоя жидкости. 1 л осадка соответствует количеству приблизительно 200 г сухого панкреатина. К каждой пробе добавляют по 1 л изопропилового спирта. Разные концентрации получают в результате разбавления абсолютного изопропилового спирта. Плотный фильтровальный осадок, полученный, как описано в примере 1 в результате двукратного промывания и отсасывания на нутче, подвергают высушиванию, как описано в примере 1, после чего определяют его активность и насыпной вес. При применении только 65%-ного изопропилового спирта наблюдается небольшое уменьшение активности. Несмотря на это качество полученного в результате продукта выше, чем качество известных продуктов. Насыпной вес продукта уменьшается с увеличением концентрации изопропилового спирта.

Результаты приведены в табл. 3.

Данные сравнения стабильности амилазы и липазы у панкреатина, приготовленного по известному и предлагаемому способам, представлены в табл. 4.

Табл. 4 показывает, что у панкреатина, полученного известными способами, потеря при нагрузке сильно возрастает по мере увеличения активности.

Что касается панкреатина, изготовленного по предложенному способу, то несмотря на существенно высокую энзимную активность, он отличается при нагрузке наименьшей потерей.

Формула изобретения

Способ получения панкреатина из поджелудочной железы путем проведения аутолиза при комнатной температуре, перемешивания с органическим растворителем, удаления осадка фильтрацией, промывания его органическим растворителем и высушивания, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода целевого продукта с более высокой активностью, аутолиз проводят в реакторе при pH 6,5-8,5 и температуре (-2)-(+30)^{0}C, при этом одновременно анализируют пробу, взятую из реактора, на осаждение в 55-65%-ном водном изопропиловом спирте и, как только в пробе достигается скорость осаждения выпавшего в осадок аутолиза 3-10 мм в течение 1-3 мин, прекращают аутолиз в реакторе путем добавления изопропилового спирта до конечной концентрации 30-35%, затем после фильтрации в полученный раствор вновь добавляют изопропиловый спирт до концентрации 55-65% при 20-24^{0}C, полученный осадок промывают 75-95%-ным изопропиловым спиртом, а высушивание проводят в среде азота при давлении 3 мбар.

Таблица 1

Продолжительность аутолиза при 20^{0}C, ч	Значение аутолиза		
	мм/0,5 мин	мм/1 мин	мм/3 мин
1,00	0	0	0
2,00	0	0	0
2,50	0	0	1
2,75	0	1	1
3,00	1	3	10
3,25	3	6	18
3,50	5	10	20
3,75	9	18	20
4,00	14	20	20

Таблица 2

Пример	pH	Аутолиз		Испытание, мм/мин	Осаждение		Промывание+сушка, % C_3H_7OH	Выход (амилаза)
		% C_3H_7OH	^{0}C		C_3H_7OH	^{0}C		
2	6,5	10	30	3	30	30	65	88
	6,5	10	30	10	30	30	65	85
3	7,0	0	-2	3	32	10	55	91
	7,0	0	-2	10	32	10	55	89
4	8,5	20	15	3	35	15	60	94
	8,5	20	15	10	35	15	60	91

Таблица 3

Пример	9	10	11	12
Промывная жидкость (% изопропилового спирта)	65	75	85	95
Активность, FiP=E/г:				
Амилаза	65	75	85	95
Липаза	84,3	93,6	93,5	93,6

Протеаза	72,3	90,3	90,5	90,4
Насыпной вес, г/100 мл	5,3	5,6	5,5	5,6

Таблица 4

Способ	Амилаза		Липаза	
	Исходная активность, FiP-E/мг	Потеря при нагрузке, %	Исходная активность, FiP-E/мг	Потеря при нагрузке, %
Известный	43,1	6	40,7	7
	57,2	43	37,0	14
	51,0	41	48,3	31
Предлагаемый	93,6	3	90,3	6