



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 266 221**

51 Int. Cl.:
A61K 35/00 (2006.01)
C07J 75/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01955372 .6**
86 Fecha de presentación : **26.07.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1307210**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2003**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para concentrar y estabilizar estrógenos conjugados de orina de yeguas.**

30 Prioridad: **01.08.2000 DE 100 37 389**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **Solvay Pharmaceuticals GmbH**
Hans-Böckler-Allee 20
30173 Hannover, DE

72 Inventor/es: **Ahnsorge, Jürgen;**
Ban, Ivan y
Rasche, Heinz-Helmer

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para concentrar y estabilizar estrógenos conjugados de orina de yeguas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento y a un dispositivo para concentrar y estabilizar los estrógenos conjugados de la orina de yeguas preñadas en soportes sólidos para obtener material de partida adecuado para la preparación de productos farmacéuticos que contienen como componente activo la mezcla natural de estos estrógenos conjugados.

10 Los estrógenos se emplean en medicina para la terapia de sustitución de hormonas. En particular se emplean mezclas de estrógenos para el tratamiento y la profilaxis de las molestias que se presentan en las mujeres en el climaterio después de una menopausia natural o artificial. Para ello, han resultado particularmente efectivas y bien tolerables las mezclas naturales de estrógenos conjugados como se encuentran en la orina de yeguas preñadas.

15 El contenido de sólidos disuelto en la orina de yeguas preñadas (a continuación abreviadamente como "PMU" (Pregnant Mares Urine) puede variar naturalmente dentro de intervalos muy amplios y se encuentra en general en el intervalo de 40-90 g de sustancia seca por litro. Aparte de la orina y las demás sustancias habitualmente contenidas en la orina, en el contenido de sólidos de la PMU están contenidos componentes fenólicos en cantidades de aproximadamente 2-5% en peso con relación a la sustancia seca. Entre estos componentes fenólicos hay cresoles y la dihidro-3,4-bis[(3-hidroxifenil)metil]-2(3H)-furanona que se conoce como HPMF. Estos pueden estar presentes en forma libre o
20 conjugada. En la PMU está contenida una mezcla natural de estrógenos que está en gran medida presente en forma conjugada, por ejemplo como sal de sodio del semiestér del ácido sulfúrico (a continuación abreviadamente como "sal de sulfato"). El contenido de estrógenos conjugados (a continuación abreviado como "CE" (Conjugated Estrogen) puede ser de 0,3 a 1% en peso calculado como sal de sulfato de estrógeno y con relación a la sustancia seca.

25 Para la preparación y obtención directa de los estrógenos conjugados que contiene la PMU se describen diversos procedimientos en el estado de la técnica. Generalmente, los extractos que contienen estrógenos conjugados de la PMU se obtienen mediante la extracción con un disolvente orgánico polar no miscible con agua o sólo poco miscible con agua como, por ejemplo, acetato de etilo, n-butanol o ciclohexanol. Sin embargo, en estas extracciones de tipo líquido-líquido se presentan una multitud de problemas como son fuerte formación de espuma, formación de sedimento, formación de emulsión y mala separación de fases. En general se requieren varias etapas de extracción, lo cual conduce a pérdidas y a una obtención sólo parcial del contenido de estrógenos. Para evitar estas desventajas se propusieron, por lo tanto, en el estado de la técnica una serie de procedimientos de extracción en fase sólida.

35 Para la preparación de pequeñas cantidades de líquidos de orina y plasma para una determinación analítica de estrógenos mediante cromatografía en fase gaseosa, Heikkinnen *et al.* (Clin. Chem. 27/7, (1981), 1186-1189) y Shackleton *et al.* (Clinica Chimica Acta 107(1980) 231-243) describen una extracción de estrógenos en fase sólida mediante un cartucho con gel de sílice silanizado que contiene residuos de octadecilsilano (Sep-Pak^R C¹⁸-cartridge, fabricante Waters Ass. Inc. Milford, MA, USA). En este caso, los estrógenos se eluyen del cartucho con metanol.

40 H.L. Bradlow propuso en 1968 (véase Steroids 11 (1968) 265-272) utilizar Amberlite XAD-2^R, una resina de poliestireno neutra, apolar, hidrófuga de la razón social Rohm & Haas, para la extracción de estrógenos conjugados de orina. La capacidad de adsorción indicada es baja. Según Bradlow se hace pasar una orina eventualmente diluida a una baja velocidad de paso a través de una columna que contiene la resina. Los estrógenos se eluyen con metanol o
45 etanol.

Las solicitudes de patente más recientes describen procedimientos para obtener un extracto que contiene las mezclas naturales de estrógenos conjugados de orina de yeguas mediante la extracción en fase sólida de la mezcla de estrógenos conjugados de la orina de yeguas preñadas en, por ejemplo, gel de sílice de fase inversa (documento WO 98/08525) o en resinas de adsorción polímeras, no iónicas, semipolares (documento WO 98/08526).

Además de la optimización precedentemente descrita del acondicionamiento directo, completo, de la orina de yeguas preñadas (PMU) para la obtención de mezclas naturales de estrógenos conjugados (CE), para el rendimiento y la calidad de la materia prima que contiene estrógeno, y de la mezcla natural de estrógenos conjugados que a partir
55 de ella se deberá aislar también son de particular importancia las etapas previas al acondicionamiento como son, por ejemplo, el asegurar un almacenamiento y una manipulación cuidadosos para el estrógeno en el lugar de recolección de la orina. En este contexto también se deberá procurar una optimización del transporte de la materia prima que contiene estrógeno recolectada desde el lugar de la recolección hasta el lugar del propio acondicionamiento y aislamiento de los estrógenos conjugados.

60 Un acondicionamiento completo de la PMU mediante, por ejemplo, extracción en fase sólida requiere personal químico-farmacéutico especializado, cualificado, para poder mantener bajo condiciones bien controlables los altos requisitos de pureza y calidad de una sustancia o mezcla de sustancias que se deberá utilizar como principio activo farmacéutico. Sin embargo, la recolección de la orina (PMU) por lo general se lleva a cabo en el entorno normal de
65 las yeguas preñadas, es decir, en acaballaderos, en un ámbito campesino y frecuentemente también en lugares más remotos. Por regla general, en esos lugares sólo existe una infraestructura simple y la recolección de la orina (PMU) y su manipulación se efectúa habitualmente por personal humilde, adiestrado para ello, al cual no se le pueden imponer exigencias demasiado estrictas en lo referente a la manipulación de la orina recolectada.

Los estrógenos conjugados (CE), cuya composición es como la excretada en la orina de yeguas preñadas, son una mezcla compleja que contiene en particular estronasulfato de sodio, equilinasulfato de sodio así como otros CE. Para el aislamiento de los CE es muy importante que la PMU se acondicione lo más rápido posible en estado reciente. Con un almacenamiento algo prolongado la orina se comienza a descomponer rápidamente. La orina adquiere un tono oscuro, huele a amoníaco y el contenido en CE disminuye mucho. La velocidad de descomposición depende de las condiciones de almacenamiento y de criterios de limpieza. Por consiguiente, puesto que se trata de grandes cantidades de líquido, la orina (PMU) recolectada hasta el momento debe ser transportada diariamente desde el lugar de la recolección hasta un lugar centralizado de acondicionamiento para poder asegurar un acondicionamiento lo más rápido posible.

Por consiguiente, existe una urgente necesidad de procedimientos y dispositivos adecuados para llevar a cabo directamente en el lugar de recolección de la orina (PMU) una concentración y estabilización de los estrógenos conjugados (CE) contenidos en la orina de yeguas preñadas, de la manera más cuidadosa posible para el producto y máxima sencillez de manipulación, así como de un transporte lo más eficiente posible desde el lugar de recolección al lugar del acondicionamiento y el aislamiento.

Por consiguiente, es objeto de la presente invención desarrollar un procedimiento técnico adecuado para la obtención de la mezcla natural de estrógenos conjugados y un dispositivo adecuado para la concentración y estabilización de los estrógenos conjugados (CE) de la orina recolectada de yeguas preñadas, que evite las desventajas precedentemente descritas. En particular, el procedimiento y el dispositivo deben permitir una concentración y estabilización de los estrógenos conjugados de la PMU con trato cuidadoso para el producto y manipulación sencilla en el lugar de recolección de la orina y un transporte lo más eficiente posible de la materia prima que contiene estrógeno, proporcionada de esta manera desde el lugar de recolección hasta el lugar del acondicionamiento y aislamiento propiamente dichos de la mezcla natural de estrógenos conjugados.

Se descubrió ahora, sorprendentemente, que los estrógenos conjugados (CE) son muy estables ligados a soportes sólidos (= agentes de adsorción) y se conservan por períodos más prolongados sin indicación alguna de una descomposición.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento acorde a la práctica, descentralizado, es decir, próximo a los acaballaderos y/o pastizales, para la concentración y estabilización de las mezclas de estrógenos conjugados (CE) de la orina de yeguas preñadas (PMU), que se caracteriza porque

- la mezcla natural de estrógenos conjugados (CE) contenida en la orina de yeguas preñadas (PMU) se concentra y estabiliza en un soporte sólido (= agente de adsorción), de manera que

- desde un recipiente de depósito se bombea en forma continua o en cantidades parciales discretas, a una velocidad de flujo preestablecida, a través de un cartucho colocado en posición vertical, una cantidad total máxima preestablecida de un líquido de orina recolectado, eventualmente previamente tamizado, y el líquido de orina que fluye al exterior se desecha, de modo que

- el cartucho está repleto de un agente de adsorción adecuado, rodeado (constantemente) de líquido para la adsorción de una cantidad predefinida de la mezcla de estrógenos conjugados (CE) contenida en el líquido de la orina, y de modo que

- la cantidad total máxima del líquido de orina bombeado a través del cartucho, la cual se preestablece como punto de control final para la carga del agente de adsorción, se ajusta a la capacidad máxima de carga del agente de adsorción para los estrógenos conjugados (CE) contenidos en el líquido de la orina.

El concepto “acorde con la práctica” significa en este caso que el procedimiento es adecuado para las condiciones de la práctica de recolección en el campo, o sea, que se puede manejar de manera sencilla y segura por parte del personal adiestrado; es decir, no es complicado y se puede llevar a cabo con la exclusión en gran medida de operaciones erróneas.

El concepto “descentralizado” significa, en este caso, que el procedimiento se puede llevar a cabo en el lugar respectivo de la operación de recolección de orina sin instalaciones químico-farmacéuticas especiales, es decir, en particular se puede llevar a cabo próximo a los acaballaderos y/o pastizales. Como “cartucho” se entiende en este caso cualquier tipo de columna cerrada con admisión y desagüe que se pueden cerrar, así como elementos de conexión, por ejemplo, acoplamiento rápidos. El concepto “cartucho” comprende también, por consiguiente, dentro del marco de la presente invención, las columnas como las que se usan habitualmente, por ejemplo, en laboratorios, en instalaciones técnicas y en fábricas químicas, y que están equipadas como se acaba de mencionar para el empleo conforme con la invención.

Según el procedimiento conforme con la invención se proporciona convenientemente una materia prima o material de partida que sirve para la preparación de productos farmacéuticos que, como principio activo, contienen la mezcla natural de estrógenos conjugados de la PMU, en la cual el contenido de la mezcla natural de estrógenos se concentra prácticamente de forma completa en el agente de adsorción (soporte) y se puede estabilizar durante un período más prolongado en las condiciones normales del entorno del respectivo lugar de recolección. Después de la carga completa (máxima) se puede recambiar fácilmente el cartucho y sustituirlo por un cartucho con agente de adsorción sin cargar.

Los cartuchos con el agente de adsorción cargado se pueden almacenar todavía bastante tiempo *in situ* a la temperatura ambiente o, en caso deseado, también con refrigeración hasta aproximadamente 4°C y, bajo ciertas condiciones, también congelado hasta aproximadamente -20°C, por ejemplo, hasta que se encuentre disponible una determinada cantidad de cartuchos cargados para un transporte colectivo conveniente a un punto centralizado de acondicionamiento. El transporte se puede llevar a cabo a las temperaturas del entorno o, como se describió precedentemente para el almacenamiento, con refrigeración o congelación. El acondicionamiento y aislamiento propiamente dichos de la mezcla natural de estrógenos conjugados (CE) puede entonces tener lugar de manera convencional en el lugar centralizado de acondicionamiento de una manera habitual para el respectivo agente de adsorción, por ejemplo, mediante lavado y elución de los CE del agente de adsorción y elaboración ulterior de manera convencional del material eluido. Por ejemplo, se puede seguir concentrando el material eluido de manera en sí conocida con el fin de obtener un concentrado en gran medida libre o completamente libre de disolventes orgánicos, adecuado para la elaboración galénica ulterior. En caso deseado, también se puede preparar una mezcla de sólidos libre de agente de elución mediante otros procesos de secado adecuados como, por ejemplo, mediante secado por atomización, secado en lecho fluidizado, liofilización o secado al vacío. Tanto el material eluido que contiene la mezcla de estrógenos como también un concentrado o un producto sólido secado por atomización producido a partir de éste se pueden incorporar de manera en sí conocida en preparados galénicos sólidos o líquidos como, por ejemplo, comprimidos, grageas, cápsulas o emulsiones.

Además del procedimiento conforme con la invención, la invención también se refiere a un dispositivo que se puede utilizar en este procedimiento, el cual tiene convenientemente en cuenta las sencillas condiciones en el lugar de empleo y garantiza que el proceso se desarrolle de forma segura y respetuosa con el producto. Este dispositivo conforme con la invención es adecuado para la concentración y estabilización acorde a la práctica, descentralizada, es decir, en particular próxima a los acaballaderos y los pastizales. A continuación se explicarán de manera general algunos parámetros de proceso adicionales, importantes, para llevar a cabo el procedimiento. Con respecto a los diseños especiales en la construcción y los aparatos de dispositivos adecuados para llevar a cabo el procedimiento conforme a la invención se remite a la siguiente descripción detallada del dispositivo conforme con la invención, a la que eventualmente deberá recurrirse en forma complementaria a la siguiente descripción general de la realización del procedimiento.

Para el procedimiento conforme con la invención se puede utilizar la PMU recolectada como tal, y mantener la cantidad de PMU diariamente recolectada para este propósito primero en un recipiente de depósito. Eventualmente, se recomienda la separación previa de impurezas mecánicas burdas como son paja, heno o análogos, por ejemplo mediante un simple cedazo de malla ancha al llenar el recipiente de depósito con la PMU acabada de recolectar. En caso deseado, se puede añadir a la orina recolectada en el recipiente de depósito conservantes, germicidas, bactericidas y/o antihelmínticos para reducir el número de gérmenes y virus.

A partir del recipiente de depósito, la PMU se bombea regularmente mediante una bomba, por ejemplo, mediante una bomba de manguera al cartucho que contiene el agente de adsorción en función de la cantidad de orina que se recibe, por ejemplo una o dos veces al día. Este cartucho presenta por lo general dimensiones y pesos que permiten una manipulación por personas de fuerza normal. En lo referente al procedimiento, se recomienda establecer las dimensiones internas del cartucho para el lecho de agente de adsorción a ser alojado de manera que pueda alojar aproximadamente 30 a 50 l de agente de adsorción y que la PMU tenga que recorrer preferentemente un trecho de aproximadamente 80 a 120 cm desde la admisión hasta el desagüe. Conforme con la invención, la adsorción de los estrógenos conjugados en el agente de adsorción tiene lugar a través del contacto de la PMU con el agente de adsorción al introducir el líquido de la orina arbitrariamente desde la cabeza o desde el fondo, en un cartucho dispuesto en forma vertical, el cual contiene el agente de adsorción, y manteniéndolo en contacto con el agente de adsorción dentro de éste durante el paso del flujo por un tiempo suficiente para la adsorción del contenido de estrógeno, hasta que la orina residual finalmente abandona el cartucho por el lado opuesto. En este caso, la PMU se introduce en el cartucho, por ejemplo, por el lado de la cabeza o del fondo, de manera que se asegure que el agente de adsorción se encuentra constantemente rodeado de líquido con el fin de excluir dentro de lo posible un indeseable flujo en seco en el cartucho.

El tiempo de contacto o, respectivamente, la velocidad de flujo se ajustan al agente de adsorción respectivo, y en el caso de adsorbentes adecuados para el procedimiento (= velocidad de carga) debería encontrarse en el intervalo de 3 a 10 volúmenes de lecho adsorbente/h, preferentemente 4 a 6 volúmenes de lecho adsorbente/h. Velocidades de carga adecuadas son, por ejemplo, 4,5 a 5,5 volúmenes de lecho adsorbente/h.

Los tiempos de contacto y velocidades de flujo especiales para los agentes de adsorción particularmente preferidos se especifican más adelante en la descripción de estos agentes de adsorción.

La cantidad total máxima de líquido de orina que se puede conducir a través del cartucho depende de la capacidad de adsorción del agente de adsorción respectivo y, en el caso de adsorbentes adecuados para el procedimiento, se debiera encontrar en el intervalo de 20 a 60 volúmenes de lecho adsorbente, preferentemente de 30 a 40 volúmenes de lecho adsorbente. Por lo general la cantidad total máxima de líquido de orina que se puede conducir por el cartucho para su carga se debe encontrar, por consiguiente, en el intervalo de 900 a 2.000 l según el agente de adsorción y el tamaño del cartucho. El respectivo valor final del volumen de paso se fija de manera preestablecida al personal de trabajo para el respectivo tipo de cartucho, en el lugar de la recolección. Para la medición de la cantidad de líquido de orina bombeada a través del cartucho se puede utilizar, por consiguiente, un contador volumétrico sencillo, preferentemente, por ejemplo, un contador de agua. Al ser alcanzada la carga máxima se puede cambiar eventualmente a un segundo cartucho paralelo y continuar con el proceso de adsorción.

Cuando se alcanza el valor final preestablecido para el cartucho, en caso deseado, antes de interrumpir el suministro de líquido, se puede lavar aún el cartucho con los CE adsorbidos, por ejemplo, con agua y/u otra solución de lavado acuosa adecuada. Después de esto, se cierran el desagüe y la admisión de líquido y seguidamente se suelta la conexión, por ejemplo, un sencillo acoplamiento rápido de la admisión del líquido al cartucho. Después de esto, el cartucho cargado se puede retirar y almacenar en un lugar adecuado hasta que tiene lugar el transporte al punto centralizado de acondicionamiento, y conectar a la admisión de líquido un nuevo cartucho sin cargar.

Después de la carga con la PMU, por ejemplo antes del recambio de un cartucho completamente cargado con PMU, o también antes de ser alcanzada la capacidad total de carga, después de etapas de carga parcial individuales, arbitrarias, se puede enjuagar además el cartucho en caso deseado con agua y/u otra solución de lavado acuosa adecuada, por ejemplo, una solución de lavado de carácter básico como particularmente, por ejemplo, hidróxido sódico acuoso diluido (por ejemplo, NaOH acuoso 0,5-2 N) para eliminar del cartucho líquido de orina residual. La cantidad de la solución de lavado no es crítica y se elige preferentemente de manera que sea suficiente para expulsar la orina residual del cartucho sin que durante ello se eliminen por lavado cantidades dignas de mención de los estrógenos conjugados. Resulta conveniente, por ejemplo, la utilización de 1-3, de preferencia aproximadamente 2 volúmenes de lecho de líquido de lavado por volumen de lecho de agente de adsorción. En este caso, el agua de lavado o la solución de lavado se conduce convenientemente a través del cartucho que contiene el agente de adsorción con una velocidad de paso de 3 a 10, preferentemente 5 a 7 partes en volumen de agua de lavado por 1 parte en volumen de agente de adsorción/hora. El agente de adsorción cargado de CE en el cartucho puede servir como materia prima o, respectivamente, material de partida para el aislamiento de CE puro para la preparación de medicamentos que contienen la mezcla natural de estrógenos conjugados.

En una variante de la invención, para una mayor estabilización del CE adsorbido se puede aclarar finalmente el cartucho, después de haber sido lavado con agua y/o solución de lavado, con una solución conservante, por ejemplo, una solución que contiene un agente de conservación, una solución acuosa de pH ajustado y/o una solución salina acuosa, antes de soltar el cartucho del dispositivo y sustituirlo por uno nuevo. Para evitar la formación de gérmenes en la columna, en particular durante el almacenamiento o el transporte sin refrigeración se pueden emplear los agentes de conservación habituales y, por ejemplo, también germicidas, bactericidas y/o antihelmínticos. Un ajuste del pH del agua de lavado se corresponderá con el respectivo agente de adsorción utilizado. Como soluciones salinas se pueden utilizar soluciones acuosas de sales orgánicas de concentraciones diversas, para las cuales se dan ejemplos en la Tabla III.I. Se recomienda particularmente el empleo de soluciones salinas también en el caso en que los cartuchos cargados con CE se deban almacenar refrigerados, en particular congelados. Las soluciones salinas preferidas son las soluciones de cloruro de sodio con concentraciones de sal de aproximadamente 10 a 35% en peso, preferentemente 25 a 33% en peso.

En un perfeccionamiento preferido del procedimiento conforme con la invención, la orina recolectada antes de ser bombeada desde el recipiente de depósito al cartucho se libera preferentemente de mucosidades y sustancias sólidas más finas. Por consiguiente, es conveniente conducir primero el líquido de la orina desde el recipiente de depósito a través de uno o varios filtros previos antes de bombear el líquido de la orina a través del cartucho. Así, por ejemplo, se puede conducir la PMU a través de al menos un dispositivo de separación en sí conocido, por ejemplo a través de una instalación de filtración con al menos un filtro de profundidad o filtro de masa filtrante sobre tamices. Como dispositivo de separación puede servir, por ejemplo, un filtro de profundidad con lecho de arena o un cartucho filtrante comercial, o se pueden utilizar filtros de masa filtrante sobre tamices o filtros de placa o filtros de bujía o filtros de saco o también tubos de filtración. Los filtros se pueden utilizar individualmente o también varios de ellos en combinación arbitraria entre sí, por ejemplo conectados en serie uno tras otro y/o en paralelo. En caso deseado, se pueden añadir además coadyuvantes de filtración al líquido de la orina (PMU) antes de la filtración. Coadyuvantes de filtración adecuados son, por ejemplo, aquellos que ligan carbonato de calcio y/o mucinas y con ello mejoran la filtración de la orina. Además, a continuación del filtro se puede acoplar eventualmente un separador de partículas, por ejemplo en el caso de emplear un lecho de arena como filtro, un separador de arena.

En sí, el experto está familiarizado con los principios y, respectivamente, la forma de realización de la filtración. Por consiguiente, con miras al problema que ha de ser resuelto por la invención entran en consideración los principios habituales de la filtración de clarificación para su empleo conforme con la invención. La filtración de clarificación tiene por objeto la depuración de la fase líquida, de manera que la pureza del filtrado es la principal magnitud de evaluación para alcanzar la meta del proceso. El proceso de separación se realiza fundamentalmente por la interacción del agente de filtración y la suspensión. Esto se debe tener en cuenta al elegir los agentes de filtración, el diseño del proceso, así como también al proyectar los aparatos filtrantes para la técnica del proceso. En la mayoría de los casos, la sustancia sólida separada influye decisivamente en el desarrollo del proceso. Así, en el caso de una suficiente proporción de sustancia sólida, y en su capacidad de formar puentes (las partículas se apoyan sobre el agente de filtración sin obstruirlo), entonces la torta filtrante que se forma y que crece continuamente asume la función de agente de filtración. En este caso de filtración de la masa filtrante sobre tamices, de filtración por la torta, es la estructura de la torta de filtración la que determina el desarrollo del proceso, mientras que el agente filtrante propiamente dicho sólo tiene una función de apoyo después de una fase de inicio. El lugar de la separación de la sustancia sólida es otra característica esencial para diferenciar los procesos de filtración. En el caso de la filtración de superficie la separación de la sustancia sólida tiene lugar en la superficie del agente filtrante por un efecto de cedazo, es decir, en razón de las relaciones de tamaño entre las partículas de sustancia sólida y los poros del agente filtrante. Contrariamente a esto, en el caso de la filtración en profundidad las partículas de sustancia sólida penetran en el agente filtrante y se depositan en el interior del mismo.

En sí, los agentes de adsorción que se pueden utilizar en el cartucho pueden ser todos los agentes de adsorción inorgánicos u orgánicos que presenten una suficiente capacidad de adsorción para la mezcla natural de estrógenos conjugados que contiene la PMU. Como agentes de adsorción para el procedimiento conforme con la invención son adecuados, por lo tanto, para su empleo en el cartucho, las resinas de adsorción polímeras, gel de sílice, gel de sílice de fase inversa o preferentemente resinas de adsorción polímeras semipolares.

Los geles de sílice hidrofugados que se pueden insertar en el cartucho como agente de adsorción son, por ejemplo, los geles de sílice de fases inversas, en sí conocidos (= geles de sílice Reverse-Phase, abreviadamente "geles de sílice RP"), los cuales son geles de sílice químicamente modificados que tienen grupos o respectivamente ligandos funcionales hidrófugos. Así, por ejemplo, son adecuados los geles de sílice RP silanizados que como grupos funcionales hidrófugos contienen radicales n-octadecildimetilsililoxi, n-octildimetilsililoxi o dimetilhidroxisililoxi. Son adecuados, por ejemplo, los geles de sílice silanizados con un tamaño medio de grano de 15 a 500 μm . Resultó ser particularmente conveniente el gel de sílice que contiene radicales dimetilhidroxisililoxi con un tamaño medio de grano en el intervalo de 0,05-0,3 mm, por ejemplo el "Kieselgel 60/Dimethylsilanderivat" de la razón social Merck. Convenientemente, el líquido de la orina se puede conducir a través del cartucho que contiene el gel de sílice a una velocidad de paso tal que el tiempo de contacto sea suficiente para la adsorción del contenido de estrógeno. Por ejemplo, son adecuadas velocidades de paso que corresponden a un caudal de 5 a 20 partes en volumen de PMU por 1 parte en volumen de gel de sílice/hora. La adsorción se lleva a cabo preferentemente a la temperatura ambiente. Convenientemente, la velocidad de paso del líquido de la orina a través del reactor se puede controlar trabajando con una leve sobrepresión (regulada por la potencia de la bomba). La cantidad de gel de sílice hidrofugado a ser utilizada puede variar según el tipo de gel de sílice empleado y la cantidad del contenido de sustancias sólidas en el líquido de orina recolectado. En el caso de una PMU prefiltrada, es decir, liberada de mucosidades y sustancias sólidas, se puede cargar, por ejemplo, una parte en volumen del gel de sílice hidrofugado con hasta 80 partes en volumen de PMU previamente tratado sin que se puedan detectar cantidades notables de estrógenos en el líquido de orina que fluye hacia el exterior.

Las resinas adsorbentes polímeras semipolares que se pueden utilizar como agente de adsorción en el cartucho son preferentemente polímeros orgánicos no iónicos, porosos, los cuales en contraposición con las resinas adsorbentes polímeras hidrófugas no polares tienen una polaridad intermedia (=, por ejemplo, con un momento dipolar de la superficie activa de la resina en el intervalo de 1,0 a 3,0, en particular 1,5 a 2,0 debye) y una estructura algo más hidrófila, por ejemplo resinas de ésteres de ácidos policarboxílicos. Convenientemente se usan resinas semipolares macroporosas con estructura preferentemente macroreticular y diámetros medios de poro en el intervalo de 50 a 150, preferentemente 70 a 100 Angström, y una superficie específica en el intervalo de 300 a 900, preferentemente 400 a 500 m^2/g . Resultan ser particularmente adecuadas las resinas macroporosas de ésteres de ácidos policarboxílicos, transversalmente reticuladas, alifáticas, en particular las resinas del ésteres poliácridílicos transversalmente reticuladas como, por ejemplo, Amberlite XAD-7^R de la razón social Rohm und Haas. El líquido de la orina se puede conducir convenientemente a través del cartucho que contiene la resina adsorbente con una velocidad de paso tal que el tiempo de contacto sea suficiente para la adsorción del contenido de estrógenos. Son adecuadas, por ejemplo, velocidades de paso que corresponden a 3 a 10, preferentemente 5 a 7 partes en volumen de PMU por 1 parte en volumen de resina adsorbente/hora. La adsorción se lleva a cabo preferentemente a la temperatura ambiente. Convenientemente, la velocidad de paso del líquido de la orina a través del reactor se puede controlar trabajando con una leve sobrepresión (regulada mediante la potencia de la bomba). La cantidad de resina adsorbente semipolar a ser aplicada puede variar según el tipo de la resina adsorbente utilizada y la cantidad de contenido de sólidos en el líquido de la orina recolectado. En el caso de utilizar PMU se puede cargar, por ejemplo, una parte en volumen de resina adsorbente, por ejemplo resina adsorbente de ésteres de ácidos policarboxílicos alifáticos, transversalmente reticulada, con hasta 80 partes en volumen de PMU previamente tratada sin que se puedan detectar cantidades notables de estrógenos en el líquido de orina que fluye hacia el exterior.

Además de los agentes de adsorción preferidos mencionados, también se pueden utilizar otras resinas adsorbentes u otros tipos de gel de sílice. Como resinas adsorbentes son adecuadas en este caso las resinas adsorbentes apolares, semipolares, así como también las polares. La cantidad de la orina que se puede bombear a través del agente de adsorción se deberá determinar previamente en base a la respectiva capacidad de adsorción. Ejemplos de resinas adsorbentes que se pueden utilizar son los tipos comerciales habituales tales como los adsorbentes polímeros Amberlite con estructuras de base de estireno-divinilbenceno (por ejemplo, los tipos XAD-1180, XAD-2, XAD-4, XAD-16), con estructuras de base de ésteres acrílicos (por ejemplo, XAD-7) o aquellas con estructuras de base altamente polares que contienen nitrógeno y oxígeno (por ejemplo, XAD-12). Otras resinas adsorbentes son las resinas Dowex (copolímeros de estireno y divinilbenceno) como, por ejemplo, Dowex 112, Dowex Optipore, Dowex Optipore V 493; Lewatite (poliestirenos reticulados), por ejemplo, Lewatit OC 1064, Lewatit OC 1066 ó Lewatit OC 1163, resinas intercambiadoras de aniones de poliamina, por ejemplo, resinas Dowex. Resinas adsorbentes ventajosas son en particular XAD-7, XAD-16 (tipo HP), XAD 118 y Dowex Optipore, preferentemente como Dowex Optipore V 493, así como Lewatite OC 1064, OC 1066 y OC 1163.

Además del procedimiento conforme con la invención precedentemente descrito, la invención se refiere también a un dispositivo que puede ser empleado en este procedimiento, el cual tiene en cuenta de manera conveniente las condiciones sencillas en el lugar de empleo y garantiza que el procedimiento se lleve a cabo de manera segura y respetuosa con el producto.

El dispositivo conforme con la invención se caracteriza por ser adecuado para la concentración y estabilización descentralizada, acorde con la práctica, es decir, en particular próxima a los acaballaderos o los pastizales, de las

ES 2 266 221 T3

mezclas de estrógenos conjugados (CE) contenidos en la orina de yeguas preñadas (PMU) sobre un soporte sólido (= agente de adsorción), comprendiendo este dispositivo:

- 5 - un cartucho dispuesto verticalmente repleto con un agente de adsorción adecuado (continuamente) rodeado de líquido para la adsorción de una cantidad predefinida de la mezcla de estrógenos conjugados (CE) contenido en el líquido de la orina de yeguas preñadas, y presentando el cartucho o bien a) una admisión de líquido dispuesta en el lado del fondo y una salida del líquido dispuesta en el lado de la cabeza, o b) una admisión de líquido dispuesta en el lado de la cabeza y una salida de líquido dispuesta en el lado del fondo,
- 10 - así como localizados corriente arriba del cartucho en la secuencia indicada y conectados a través de mangueras
- una bomba, un contador volumétrico y un medidor de cantidades de paso.

15 El dispositivo conforme con la invención se destina a la ejecución del procedimiento precedentemente descrito para la concentración y estabilización descentralizada, acorde con la práctica, de los estrógenos conjugados (CE) contenidos en la PMU. En caso deseado, el dispositivo también puede contener dos cartuchos conectados en paralelo, los cuales se hacen funcionar sucesiva o bien alternativamente.

20 El cartucho que se utiliza en el dispositivo conforme con la invención puede tener dimensiones que con relación a la altura y el diámetro se encuentran dentro de un amplio marco. Sin embargo, para no dificultar la manipulación en la práctica, las dimensiones del cartucho en lo referente a tamaño y peso deberían ser tales para que se pueda manipular y cargar bien a mano por una persona de fuerza normal, por ejemplo para recambiar cartuchos cargados por cartuchos nuevos sin cargar. Por ejemplo, el cartucho debería estar dimensionado aproximadamente de tal modo que el cartucho presentase dimensiones internas para el lecho de agente de adsorción que permitan alojar 30 a 50 l de agente de adsorción, para lo cual la altura interna se situará en particular en el intervalo de 80 a 120 cm. Generalmente, el diámetro interno del cartucho se situará en 10 a 25 cm. El experto estará en condiciones de dar al cartucho un dimensionado exacto para asegurar condiciones de flujo óptimas durante el funcionamiento.

30 Además, el cartucho que se utiliza en el dispositivo conforme con la invención se compone convenientemente de materiales robustos, resistentes al uso y resistentes a los productos químicos como los que se utilizan habitualmente en la preparación de aparatos para la industria química, por ejemplo, vidrio de laboratorio resistente a los golpes, material sintético y/o metal como, por ejemplo, chapa de acero.

35 En el dispositivo conforme con la invención se puede utilizar en sí cualquier tipo de bomba, de construcción sencilla y robusta como, por ejemplo, monobombas, bombas de manguera o bombas de membrana. Por ejemplo, para el dispositivo conforme con la invención resultó conveniente como bomba una bomba de manguera.

40 En el dispositivo conforme con la invención se puede utilizar en sí cualquier tipo de medidores de cantidades de paso, de construcción sencilla y robusta como, por ejemplo, rotámetros, contadores volumétricos de aspas giratorias o contadores volumétricos inductivos. Por ejemplo, como contador volumétrico para el dispositivo conforme con la invención resultó conveniente un rotámetro con flotador.

45 En el dispositivo conforme con la invención, para la medición de las cantidades de líquido de orina bombeadas a través del cartucho se pueden utilizar medidores de cantidad de paso de cualquier tipo, de construcción sencilla y robusta como, por ejemplo, contadores de agua o caudalómetros inductivos. Como medidor de la cantidad de paso para el dispositivo conforme con la invención resultó conveniente, por ejemplo, un contador de agua.

50 En una variante conveniente del dispositivo conforme con la invención, entre la bomba y el contador volumétrico se intercalan adicionalmente al menos uno o varios filtros previos, por ejemplo filtros de profundidad o filtros de masa filtrante. En el caso de los filtros se puede tratar, por ejemplo, de un filtro de profundidad con lecho de arena o de un cartucho filtrante comercial, o de filtros de masa filtrante o filtros de placa o filtros de bujía o filtros de saco o, también, tubos de filtración comerciales. Además, corriente abajo del filtro previo se puede disponer eventualmente un separador de partículas, por ejemplo, en el caso de un lecho de arena como filtro previo, un subsiguiente separador de arena. En variantes del dispositivo los filtros se puede conectar individualmente o también varios de ellos en combinación arbitraria entre sí, por ejemplo en serie uno tras otro y/o conectados en paralelo. Un perfeccionamiento ventajoso de esta variante se caracteriza por el hecho de que el filtro previo es un módulo de dos filtros previos conectados en paralelo, que funcionan alternativamente de forma individual y que incluso en el caso de un funcionamiento continuo del dispositivo se pueden intercambiar por un nuevo filtro previo. Otro perfeccionamiento conveniente de estas variantes se caracteriza porque la instalación filtrante se compone de una unidad de filtración previa conectada en serie, que consta de filtro previo (por ejemplo, filtro de saco) y uno o dos filtros de lecho profundo y, a continuación de estos, dos filtros absolutos conectados en paralelo (por ejemplo, filtros de membrana), de modo que los filtros absolutos funcionan alternativamente de forma individual e incluso en funcionamiento continuo del dispositivo se pueden intercambiar por un nuevo filtro. Además, es eventualmente conveniente que en el dispositivo conforme con la invención se intercale en cada caso un manómetro entre la bomba y el filtro previo, así como también un manómetro en la zona situada después del filtro previo, preferentemente después del contador volumétrico, para controlar el funcionamiento correcto del filtro previo.

Para explicar adicionalmente el dispositivo conforme con la invención en una forma de ejecución preferida sirve la Figura 1 que muestra en forma esquemática un dispositivo para la estabilización y concentración de CE a partir de PMU. En la Figura 2 se reproduce una representación esquemática del modo operativo de una variante de la filtración de orina bruta.

El procedimiento conforme con la invención y el dispositivo conforme con la invención presentan una serie de ventajas de las cuales a continuación se mencionan brevemente las más importantes. La concentración de los CE, es decir, la carga de las columnas con agente de adsorción se puede llevar a cabo directamente en el lugar de la recolección. Con ello se suprime el transporte diario de grandes cantidades de líquido de orina a un lugar de acondicionamiento centralizado. La carga se puede llevar a cabo durante un período de tiempo más prolongado, de hasta varias semanas, en forma continua hasta que se sature la columna de adsorción; en el caso de la resina de adsorción XAD-7, por ejemplo, la cantidad de orina adsorbida es de aproximadamente 35 volúmenes de lecho. La orina residual liberada de los CE permanece en el lugar de la recolección, en el cual de todos modos existen dispositivos adecuados para la evacuación. Se transporta la columna cargada, es decir, sólo aproximadamente 1/35 del peso original del líquido de orina. El transporte se puede efectuar a intervalos de tiempo mayores. El transporte también puede requerir un tiempo más largo, por ejemplo bien puede prolongarse hasta por algunas semanas. Debido a la buena estabilidad de los CE en la columna adsorbente no se espera descomposición alguna. Se suprime el tratamiento de grandes cantidades de orina mediante separador e instalación de ultrafiltración, puesto que la separación de las sustancias mucilaginosas y los sedimentos eventualmente presentes en la orina de partida se lleva a cabo mediante filtros de masa filtrante o de profundidad (por ejemplo, filtros de arena, cartuchos filtrantes, filtros de masa filtrante sobre tamices, filtros de placa, filtros de bujía, filtros de saco o tubos de filtración) robustos y exentos de mantenimiento que, en caso necesario, se pueden recambiar con facilidad.

Las figuras y los ejemplos siguientes deberán explicar la invención con más detalle, pero sin limitar su alcance.

Figuras

Fig. 1

Dispositivo esquemático conveniente para la estabilización y concentración de CE a partir de PMU; los elementos del dispositivo tienen el significado siguiente: (1) = admisión del líquido de orina del recipiente de depósito; (2) = bomba, por ejemplo, bomba de manguera; (3) = tuberías de conexión; (4) = manómetro; (5) = válvula de tres vías; (6) = acoplamiento rápido; (7) = válvulas de cierre; (8) = filtros; (9) = contador volumétrico con flotador (rotámetro); (10) = medidor de cantidades de paso, por ejemplo, contador de agua; (11) = cartucho, columna; (12) = lecho de agente de adsorción; (13) = desagüe.

Fig. 2

Representación esquemática de una forma del procedimiento para la filtración de orina bruta, en el cual la instalación filtrante consta de un módulo de una unidad de prefiltración conectada en serie, que comprende un filtro previo (por ejemplo, filtro de saco) y uno o dos filtros de lecho profundo y, a continuación, de ellos dos filtros absolutos conectados en paralelo (por ejemplo, filtros de membrana).

Ejemplos

Ejemplo 1

Instrucción general de trabajo para la concentración y estabilización de los estrógenos conjugados (CE) contenidos en la orina de yeguas preñadas (PMU) directamente en el lugar de la recolección del PMU mediante la adsorción por un agente de adsorción contenido en un cartucho.

Para ello, la PMU recolectada se vierte en un recipiente de depósito, en cada caso a través de un embudo equipado con un cedazo. El cedazo tiene una amplitud de malla gruesa y solamente sirve para separar impurezas mecánicas gruesas como paja, heno, etc.

El procedimiento se explica a continuación como ejemplo utilizando una columna adsorbente (como cartucho) con una resina adsorbente semipolar. Si se utilizan cartuchos con otros adsorbentes, entonces eventualmente la manipulación y en particular el acondicionamiento del cartucho cargado se rigen conforme al tipo del agente de adsorción respectivo. El proceso de carga y el lavado final del cartucho en el lugar de la recolección de la orina se conserva sustancialmente igual a lo que se describe bajo A) y B), o eventualmente se adapta solamente en aspectos menores a posibles condiciones especiales en el campo o del respectivo agente de adsorción.

A) Adsorción del contenido de estrógeno de la PMU por un agente de adsorción

La adsorción del contenido en CE de la PMU se lleva a cabo en una instalación de adsorción como se esboza como ejemplo en la Fig. 1. Una cantidad total de PMU preestablecida con relación a la capacidad del cartucho o, respectivamente, de la columna adsorbente se bombea a la temperatura ambiente, eventualmente después de un tamizado y eventualmente filtración previos, en su totalidad o en partes, a una velocidad de paso preestablecida a través

de una columna o, respectivamente, cartucho repleto de un agente de adsorción. Como agente de adsorción se puede utilizar, por ejemplo, una resina adsorbente de éster poliacrílico semipolar expandida en agua (= Amberlite XAD-7 de la razón social Rohm und Haas, tamaño de grano 0,3 a 1,2 mm, momento dipolar 1,8 debye, diámetro medio de poros 80 Angström, superficie específica aproximadamente 450 m²/g, seca) u otros adsorbentes adecuados. Después de alcanzar la cantidad de carga máxima preestablecida de PMU se detiene la alimentación de PMU a la columna o, respectivamente, al cartucho y, en caso deseado, se bombea desde la columna o, respectivamente, cartucho cargado a una columna o, respectivamente, cartucho libre conectado en paralelo. El contenido en estrógeno de la PMU se adsorbe completamente en la columna adsorbente, cargada de esta manera.

10 B) *Lavado de la columna adsorbente cargada*

La columna o, respectivamente, cartucho adsorbente cargado se lava después de finalizado el proceso de adsorción facultativamente con agua u otra solución de lavado acuosa, por ejemplo una solución de lavado alcalina como, en particular, lejía diluida de hidróxido sódico (por ejemplo, NaOH 0,5-2 N). Para ello, el agua de lavado o la solución de lavado se bombea asimismo a través de la columna o respectivamente del cartucho a la temperatura ambiente con una velocidad de paso preestablecida de, por ejemplo, aproximadamente 5,5 volúmenes de lecho por hora. El líquido de lavado que se sale se desecha.

20 C) *Almacenamiento y transporte*

Para el transporte de retirada o, respectivamente, para el almacenamiento intermedio de la columna adsorbente cargada, ésta se cierra por ambos lados después de terminado el proceso de adsorción o, respectivamente, después del lavado facultativo con, por ejemplo, agua (o con otra solución de lavado acuosa, eventualmente alcalina, como en particular hidróxido sódico diluido, por ejemplo, NaOH 0,5-2 N), se desconecta del dispositivo de carga y se almacena en un lugar adecuado. El almacenamiento puede tener lugar a la temperatura ambiente, por ejemplo 15 a 30°C en una nave de almacenamiento normal, o bien en una cámara frigorífica a hasta aproximadamente 4°C. Si el líquido que se encuentra en la columna adsorbente se protege contra congelamiento se puede también almacenar a temperaturas más bajas, por ejemplo hasta -20°C. Las columnas o, respectivamente, cartuchos cargados se transportan a intervalos regulares de unos días hasta algunas pocas semanas desde el lugar de recolección y almacenamiento a un lugar centralizado de acondicionamiento en donde se garantiza el acondicionamiento y aislamiento químico de los estrógenos conjugados de una manera experta.

30 D) *Desorción de los estrógenos conjugados de la columna o, respectivamente, cartucho adsorbente*

El acondicionamiento de las columnas o, respectivamente, cartuchos cargados para separar las impurezas y aislar los CE se lleva a cabo de manera habitual para el agente de adsorción respectivo. En el caso de utilizar una resina de adsorción semipolar del tipo Amberlite, por ejemplo, XAD-7, el acondicionamiento se puede llevar a cabo como en la solicitud de patente internacional WO 98/08526. Para ello, se hace pasar el fluido de elución con una velocidad de flujo adecuada a través de la columna o, respectivamente, cartucho precalentado a 45°C. La sustancia eluida que sale se recoge en fracciones. La primera fracción corresponde a aproximadamente 1 volumen de lecho, las fracciones restantes son en cada caso de aproximadamente 0,75 volumen de lecho. Las fracciones individuales se analizan mediante HPLC con respecto a su contenido en sal de sulfato de estrógeno, cresol y HPMF. La primera fracción se recoge durante el tiempo que la sustancia eluida aparece desde incolora hasta de coloración débilmente amarilla. Esta fracción por lo general solamente contiene trazas de sal de sulfato de estrógeno.

Después de haber salido el primer volumen de lecho de sustancia eluida se produce un cambio de color en la sustancia eluida a un tono de color pardo oscuro intenso. En las siguientes 2 a 4 fracciones se encuentran entonces contenidos regularmente, aproximadamente 80 a 98% de la totalidad de los estrógenos conjugados adsorbidos en la columna. Las fracciones restantes solamente contienen todavía cantidades pequeñas de sal de sulfato de estrógeno. Esto también es claramente visible en la reducción de la intensidad del color. Eventualmente se pueden seguir acondicionando las fracciones residuales después de eliminar por destilación el contenido de disolvente y aislar más CE.

Las fracciones principales que contienen los estrógenos conjugados tienen en cada caso elevados contenidos en SS (SS = sustancia seca, determinada por HPLC) de sal de sulfato de estrógeno y están libres de cresol y HPMF, en tal grado que estas fracciones ya constituyen extractos adecuados para un procesamiento galénico ulterior.

55 E) *Regeneración de las columnas de resina adsorbente*

La regeneración de las columnas o, respectivamente, cartuchos cargados se lleva a cabo de la manera en cada caso habitual para el respectivo agente de adsorción. En el caso de utilizar una resina adsorbente semipolar del tipo Amberlite, por ejemplo XAD-7, la regeneración se puede llevar a cabo como en la solicitud de patente internacional WO 98/08526. Para la regeneración, la columna o, respectivamente, el cartucho se lava primero con una mezcla de etanol/agua que contiene 50% en peso de etanol, ajustada a pH 12, luego con una solución acuosa de citrato de sodio al 10% en peso y nuevamente con la mezcla de etanol/agua y, finalmente, con agua destilada. Toda la regeneración se lleva a cabo para la resina adsorbente especificada como ejemplo a una temperatura de 45°C, pudiéndose introducir también en este caso las soluciones de regeneración y lavado a través de la columna o, respectivamente, el cartucho por el lado del fondo o de la cabeza. La columna o, respectivamente, el cartucho se puede cargar y regenerar de nuevo varias veces, por ejemplo, hasta 40 veces.

ES 2 266 221 T3

Ejemplo 2

Pruebas de estabilidad con columnas de adsorción cargadas, para determinar el contenido en CE desorbible

5 Para analizar la estabilidad de la columna, es decir, la estabilidad de los CE adsorbidos (estrógenos conjugados) se llevaron a cabo pruebas de estabilidad con columnas de adsorción cargadas con orina de partida. Para este propósito se cargaron de la manera habitual columnas de adsorción, a continuación se retiró la resina adsorbente de la columna y se almacenó a dos temperaturas a lo largo de diversos períodos de tiempo. Después de transcurrido el tiempo de almacenamiento se eluyó la sustancia adsorbida y se analizó con respecto a su contenido en CE e impurezas. El resultado obtenido se comparó con el resultado de la elución de las pruebas de control, es decir, pruebas sin tiempo de almacenamiento.

A) Ejecución de la prueba

15 La absorción se llevó a cabo respectivamente en una columna de 3 l repleta de manera conocida con resina adsorbente semipolar del tipo XAD 7 (resina adsorbente semipolar de éster poliacrílico, es decir, Amberlite XAD-7 de la razón social Rohm und Haas, tamaño de grano 0,3 a 1,2 mm, momento dipolar 1,8 debye, diámetro medio de poros 80 Angström, superficie específica aproximadamente 450 m²/g, seca). Para ello, la columna se alimentó con una cantidad previamente ultrafiltrada de 90 l (= 30 volúmenes de lecho) de orina de yeguas (procedente de Polonia) a la temperatura ambiente, con una velocidad de paso de 5 volúmenes de lecho por hora. El contenido en estrógenos de la PMU se adsorbió completamente en la columna de resina adsorbente semipolar cargada de esta manera. Después de terminada la carga de la columna con la orina de yegua se lavó con 3 l de agua y la resina cargada se extrajo de la columna y se distribuyó en 10 muestras de 300 ml, y éstas se transfirieron a columnas más pequeñas. Una muestra se desechó.

25 A continuación se siguió procediendo como sigue:

1. Elución inmediata de la muestra de control, es decir, sin almacenamiento.
2. Almacenamiento de las respectivas muestras restantes a 4°C ó a 25°C.
3. Elución de las muestras 1 (4°C) y 2 (25°C) después de un almacenamiento de una semana.
4. Elución de las muestras 3 (4°C) y 4 (25°C) después de un almacenamiento de dos semanas.
5. Elución de las muestra 5 (4°C) y 6 (25°C) después de un almacenamiento de cinco semanas.
6. Elución de las muestras 7 (4°C) y 8 (25°C) después de un almacenamiento de ocho semanas.

40 La elución se llevó a cabo de manera en sí conocida lavando primero la resina adsorbente cargada con una solución acuosa de hidróxido de sodio. Después de cada etapa de lavado se analizó el respectivo líquido de lavado mediante HPLC con respecto a su contenido en estrona (como sal de sulfato), equilina, cresol y HPMF.

45 Como líquido de elución se utilizó una mezcla de agua/etanol (al 30% en peso, valor pH 12) alcalinizada por adición de hidróxido de sodio, y la elución de la resina se llevó a cabo a una temperatura de elución de 45°C. La sustancia eluida se recogió en fracciones y las fracciones individuales se analizaron, a su vez, mediante HPLC con respecto a su contenido en estrona, cresol y HPMF. La primera fracción se recogió durante el tiempo en que la sustancia eluida aparecía desde incolora hasta con color levemente amarillo. Esta fracción sólo contiene trazas de estrona (sal de sulfato de estrógeno). Después de haber desaguado el primer volumen de lecho de sustancia eluida se produce un cambio de color de la sustancia eluida a un tono de color pardo oscuro intenso. En las siguientes 2 a 4 fracciones se encuentra contenida entonces aproximadamente 80 a 98% de la cantidad total de estrógenos conjugados adsorbidos en la columna. Las fracciones restantes para la regeneración de la resina (a respectivamente 45°C con etanol al 50% en peso con pH 12, citrato de sodio al 10% en peso y agua, en la secuencia indicada) ya solamente contienen pequeñas cantidades de sal de sulfato de estrógeno. Esto también es claramente visible debido a la reducción de la intensidad del color.

B) Resultados

60 Los resultados obtenidos en las pruebas de estabilidad de la columna para las pruebas individuales se reproducen en las Tablas I.0 a I.9 y se compilan en la Tabla I.10, y a continuación se explicarán adicionalmente.

65 La carga de la columna o, respectivamente, el cartucho, con orina, véase Tabla I.0, así como la elución de la columna de control, Tabla I.1 muestran un desarrollo normal de la adsorción y desorción. Es cierto que se encontraron valores incrementados de cresol y HPMF en la sustancia eluida, lo cual sin embargo probablemente se debe en gran medida a un flujo no completamente laminar en la columna y a los valores muy elevados de cresol, de aproximadamente 1000 mg/l, en la orina de partida.

ES 2 266 221 T3

Las Tablas I.2 a I.9 reproducen los resultados para la elución después del almacenamiento durante una, dos, cinco y ocho semanas. Fundamentalmente se comprueba que las hormonas adsorbidas (CE) por regla general se desorben cuantitativamente. Eventualmente, por ejemplo en particular después de sólo una semana de almacenamiento a 25°C, se comprueba una desorción cuantitativa sólo en la regeneración etanólica al 50%, sin embargo en este caso sólo se trata de la desorción de cantidades residuales del CE, y que la mayor parte ya se pudo aislar antes en la desorción propiamente dicha. No parece que exista una dependencia de la desorción del tiempo de almacenamiento y de la temperatura o, en todo caso, sólo existe de manera limitada, por ejemplo siempre cuando las condiciones de flujo eventualmente no óptimas en las columnas pequeñas pueden desempeñar un mayor papel. Pero, en cualquier caso, la sustancia eluida está en gran medida libre de cresol y HPMF. Por consiguiente, para obtener resultados óptimos se debe cuidar de un flujo óptimo a través de la columna, independientemente del tiempo de almacenamiento. Por lo tanto, las columnas o, respectivamente, cartuchos deben estar continuamente inmersos en líquido, es decir, se debe evitar un flujo en seco.

Los resultados después de un almacenamiento durante cinco semanas, Tablas I.6 a I.7 muestran para una temperatura de 4°C un buen desarrollo de la elución; para T = 25°C todavía aparecen, por cierto, porciones de hormonas en la sustancia regenerada. Los contenidos en HPMF y cresol en la sustancia eluida son muy bajos en ambos casos.

Sorprendentemente se obtienen muy buenos resultados incluso después de un almacenamiento muy largo, como se muestra para el almacenamiento de ocho semanas con excelentes resultados en las Tablas I.8 a I.9. Los picos de elución para estrona y equilina son muy empinados o pronunciados, es decir, el volumen de la sustancia de CE eluida es muy pequeña. Los valores de cresol y HPMF tienden a cero.

La Tabla I.10 reproduce todas las pruebas en una relación sinóptica. La suma, por ejemplo, del contenido en estrona de la sustancia eluida y de la sustancia regenerada en todos los casos se encuentra dentro de aproximadamente 1055 mg $\pm$ 4% y corresponde con ello al balance esperado.

Por consiguiente, recopilando se puede sostener que el almacenamiento de una a ocho semanas de la resina XAD-7 cargada a temperaturas de 4°C y 25°C ciertamente muestra diferencias en el comportamiento de la elución, altura y anchura de los picos hormonales, pero no, sin embargo, en la suma del total de hormonas eluidas, las cuales en conjunto se encuentran en el intervalo de 1055 mg $\pm$ 4% en lo referente al contenido de estrona. De esto se puede deducir que las diferencias cualitativas observadas en gran medida sólo se deben a las condiciones de flujo no homogéneas en las columnas relativamente pequeñas que se utilizaron y las cuales se pueden evitar fácilmente con columnas o, respectivamente, cartuchos de dimensiones acordes a la práctica.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 266 221 T3

TABLA I.0

Prueba de columna con respecto a la estabilidad del material en la columna

Carga de la columna con orina nativa de Polonia, ultrafiltrada

Agente de adsorción XAD 7, volumen = 3 l

Después del aporte a la columna se evacúa la resina y se lava con 3 l de agua. La resina se divide en partes iguales de 300 ml y se somete a una prueba de estabilidad de la columna. Un paquete de resina se eluye inmediatamente, los demás se almacenan a la temperatura ambiente y en el frigorífico.

a) Muestras	Volumen l	Estrona mg/l	HPMF mg/l	Cresol mg/l	Equilina mg/l
Solución de partida (= después de la ultrafiltración)					
Solución de control 1	30	85,4	67,2	908,0	50,1
Solución de control 2	30	117,7	96,9	990,4	70,0
Solución de control 3	30	137,6	105	997,5	80,2
	90	113,567	89,7	965,3	66,8
	= 30 VL	= promedio			

b) Pruebas	Vol. l	Tiempo h	Flujo l/h	Flujo VL/h	Estrona mg/l	Equilina mg/l	HPMF mg/l	HPMF mg	Cresol mg/l	Cresol mg
Desagüe 1	10	0,7	15	5,0	0,0	0,0	142,6	1426,0	2,7	27,0
Desagüe 2	10	0,7	15	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	22,0
Desagüe 3	10	0,7	15	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	8,0
Desagüe 4	10	0,7	15	5,0	0,0	0,0	148,5	1485,0	1,4	14,0
Desagüe 5	10	0,7	15	5,0	0,0	0,0	150,6	1506,0	5,2	52,0
Desagüe 6	10	0,7	15	5,0	0,0	0,0	153,7	1537,0	27,3	273,0
Desagüe 7	10	0,7	15	5,0	0,0	0,0	153,8	1538,0	81,9	819,0
Desagüe 8	10	0,7	15	5,0	0,0	0,0	155,7	1557,0	322,4	3224,0
Desagüe 9	10	0,7	15	5,0	0,0	0,0	154,2	1542,0	770,5	7705,0

Tabla I.1:

Prueba de columna con respecto a la estabilidad del material de la columna
 Elución sin almacenamiento
 Agente de adsorción: XAD 7, volumen = 300 ml
 Solución de partida: orina nativa de Polonia, ultrafiltrada

Muestras	Vol. ml	Tiempo min	Flujo ml/min	Flujo VL/h	pH	SS %	Estrona mg/l	Estrona mg	HPMF mg/l	HPMF mg	Cresol mg/l	Cresol mg	Equilina mg/l	Equilina mg
----------	------------	---------------	-----------------	---------------	----	---------	-----------------	---------------	--------------	------------	----------------	--------------	------------------	----------------

Solución de partida: 90 l cargados a una columna de 3L (Tabla I.1, Resina distribuida en 10 partes de 300 ml)

Contenido de partida	7700						113,6	874,7	89,7	690,7	965,3	7432,8	66,8	514,4
-------------------------	------	--	--	--	--	--	-------	-------	------	-------	-------	--------	------	-------

Lavado: Agua con NaOH (2%), pH 13

Lavado 1	300	12	25	5,0	9,4		102,6	30,8	37,2	11,2	1423,1	426,9	53,6	16,1
Lavado 2	300	12	25	5,0	13,1		29,5	8,9	216,0	64,8	5000	1500,0	48,8	14,6
Lavado 3	300	12	25	5,0	13,1		12,8	3,8	110,8	33,2	5000	1500,0	30,5	9,2
Lavado 4	300	12	25	5,0	13,2		9,8	2,9	45,7	13,7	2000	600,0	9,8	2,9
Lavado 5	300	12	25	5,0	13,2		8,4	2,5	54,1	16,2	1023,3	307,0	5,0	1,5

Elución: Etanol 30%, 45°C, pH 12

Eluato 1	300	12	25	5,0	13,1	3,6	109,2	32,8	585,1	175,5	565,8	169,7	56,3	16,9
Eluato 2	300	12	25	5,0	13,0	1,9	2099,2	629,8	0,0	0,0	394,8	118,4	1209,8	362,9
Eluato 3	300	12	25	5,0	12,7	0,6	815,6	244,7	1,0	0,3	119,9	36,0	466,9	140,1
Eluato 4	300	12	25	5,0	12,5	0,2	268,8	80,6	0,0	0,0	50,8	15,2	150,2	45,1
Eluato 5	300	12	25	5,0	12,3	0,1	87,2	26,2	0,0	0,0	21,6	6,5	44,8	13,4

Regeneración: 50 % etanol, 45°C, pH 12

Regenerado 1	600	24	25,0	5,0	12,2		39,1	23,5	0,0	0,0	12,0	7,2	18,8	11,3
-----------------	-----	----	------	-----	------	--	------	------	-----	-----	------	-----	------	------

Regeneración: Citrato de sodio 10% / agua, ambos 45°C

Regenerado 2	600	24	25		11,7		2,9		0,0		5,9		1,1	
Regenerado 3	600	24	25		11,3		1,4		0,0		3,8		0,0	

Tabla I.2:
Prueba de columna con respecto a la estabilidad del material de la columna
Elución después de 7 días de almacenamiento, 4°C
Agente de adsorción: XAD 7, volumen = 300 ml
Solución de partida: orina nativa de Polonia, ultrafiltrada

Muestras	Vol. ml	Tiempo min	Flujo ml/min	Flujo VL/h	pH	SS %	Estrona mg/l	Estrona mg	HPMF mg/l	HPMF mg	Cresol mg/l	Cresol mg	Equilina mg/l	Equilina mg
Solución de partida: 90 l cargados a una columna de 3L (Tabla I.1, Resina distribuida en 10 partes de 300 ml)														
Contenido de partida	7700						113,6	874,7	89,7	690,7	965,3	7432,8	66,8	514,4
Lavado: Agua con NaOH (2%), pH 13														
Lavado 1	300	12	25	5,0	9,5		89,6	26,9	88,6	26,6	2604,6	781,4	42,2	12,7
Lavado 2	300	12	25	5,0	13,1		33,7	10,1	343,7	103,1	5396,9	1619,1	58,3	17,5
Lavado 3	300	12	25	5,0	13,1		9,0	2,7	32,4	9,7	1343,0	402,9	4,7	1,4
Lavado 4	300	12	25	5,0	13,1		9,1	2,7	0,0	0,0	611,3	183,4	4,7	1,4
Lavado 5	300	12	25	5,0	13,1		9,3	2,8	4,3	1,3	184,0	55,2	4,6	1,4
Elución: Etanol 30%, 45°C, pH 12														
Eluato 1	300	12	25	5,0	13,1	3,4	174,2	52,3	4,8	1,4	129,0	38,7	92,1	27,6
Eluato 2	300	12	25	5,0	13,0	1,7	1362,7	408,8	0,0	0,0	167,2	50,2	801,0	240,3
Eluato 3	300	12	25	5,0	12,6	0,6	887,8	266,3	0,0	0,0	99,5	29,9	512,8	153,8
Eluato 4	300	12	25	5,0	12,4	0,4	433,6	130,1	0,0	0,0	52,9	15,9	250,0	75,0
Eluato 5	300	12	25	5,0	12,4	0,2	231,0	69,3	0,0	0,0	30,7	9,2	133,4	40,0
Regeneración: 50 % etanol, 45°C, pH 12														
Regenerado 1	600	24	25,0	5,0	12,4		171,6	103,0	0,0	0,0	27,8	16,7	96,1	57,7
Regeneración: Citrato de sodio 10% / agua, ambos 45°C														
Regenerado 2	600	24	25		12,1		18,8	11,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Regenerado 3	600	24	25		11,2		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabla I.3:

Prueba de columna con respecto a la estabilidad del material de la columna
 Elución después de 14 días de almacenamiento, 25°C
 Agente de adsorción: XAD 7, volumen = 300 ml
 Solución de partida: orina nativa de Polonia, ultrafiltrada

Muestras	Vol. ml	Tiempo min	Flujo ml/min	Flujo VL/h	pH	SS %	Estrona mg/l	Estrona mg	HPMF mg/l	HPMF mg	Cresol mg/l	Cresol mg	Equilina mg/l	Equilina mg
Solución de partida: 90 l cargados a una columna de 3L (Tabla I.1, Resina distribuida en 10 partes de a 300 ml)														

Contenido de partida	7700						113,6	874,7	89,7	690,7	965,3	7432,8	66,8	514,4
Lavado: Agua con NaOH (2%), pH 13														

Lavado 1	300	12	25	5,0	10,0		98,7	29,6	168,7	50,6	4051,7	1215,5	66,0	19,8
Lavado 2	300	12	25	5,0	13,0		26,1	7,8	208,3	62,5	4701,1	1410,3	48,4	14,5
Lavado 3	300	12	25	5,0	13,1		8,0	2,4	55,0	16,5	3122,5	936,8	6,6	2,0
Lavado 4	300	12	25	5,0	13,1		8,3	2,5	30,6	9,2	1710,5	513,2	5,0	1,5
Lavado 5	300	12	25	5,0	13,3		8,7	2,6	15,1	4,5	652,9	195,9	5,8	1,7
Elución: Etanol 30%, 45°C, pH 12														

Eluato 1	300	12	25	5,0	13,1	3,4	182,6	54,8	11,2	3,4	323,0	96,9	96,1	28,8
Eluato 2	300	12	25	5,0	13,0	1,7	904,3	271,3	0,0	0,0	216,5	65,0	521,3	156,4
Eluato 3	300	12	25	5,0	12,8	0,8	949,0	284,7	0,0	0,0	138,6	41,6	552,1	165,6
Eluato 4	300	12	25	5,0	12,5	0,5	611,1	183,3	0,0	0,0	82,7	24,8	347,3	104,2
Eluato 5	300	12	25	5,0	12,4	0,4	343,3	103,0	0,0	0,0	46,9	14,1	192,4	57,7
Regeneración: 50 % etanol, 45°C, pH 12														

Regenerado 1	600	24	25,0	5,0	12,5		191,8	115,1	0,0	0,0	32,0	19,2	102,7	61,6
Regeneración: Citrato de sodio 10% / agua, ambos 45°C														

Regenerado 2	600	24	25		12,3		19,0	11,4	0,0	0,0	7,9	4,7	10,0	6,0
Regenerado 3	600	24	25		11,3		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabla I.4:

Prueba de columna con respecto a la estabilidad del material de la columna
Elución después de 14 días, 4°C
Agente de adsorción: XAD 7, volumen = 300 ml
Solución de partida: orina nativa de Polonia, ultrafiltrada

Muestras	Vol. ml	Tiempo min	Flujo ml/min	Flujo VL/h	pH	SS %	Estrona mg/l	Estrona mg	HPMF mg/l	HPMF mg	Cresol mg/l	Cresol mg	Equilina mg/l	Equilina mg
----------	------------	---------------	-----------------	---------------	----	---------	-----------------	---------------	--------------	------------	----------------	--------------	------------------	----------------

Solución de partida: 90 l cargados a una columna de 3L (Tabla I.1, Resina distribuida en 10 partes de 300 ml)

Contenido de partida	7700						113,6	874,7	89,7	690,7	965,3	7432,8	66,8	514,4
-------------------------	------	--	--	--	--	--	-------	-------	------	-------	-------	--------	------	-------

Lavado: Agua con NaOH (2%), pH 13

Lavado 1	300	12	25	5,0	9,3		77,3	23,2	42,6	12,8	1255,9	376,8	55,9	16,8
Lavado 2	300	12	25	5,0	13,1		28,0	8,4	454,6	136,4	6000,0	1800,0	139,3	41,6
Lavado 3	300	12	25	5,0	13,1		8,8	2,6	30,2	9,1	494,3	148,3	9,4	2,8
Lavado 4	300	12	25	5,0	13,1		8,2	2,5	0,0	0,0	44,3	13,3	5,3	1,6
Lavado 5	300	12	25	5,0	13,2		8,0	2,4	0,0	0,0	14,5	4,4	4,7	1,4

Elución: Etanol 30%, 45°C, pH 12

Eluato 1	300	12	25	5,0	13,1	3,5	79,8	23,9	5,0	1,5	34,2	10,3	45,6	13,7
Eluato 2	300	12	25	5,0	12,8	1,8	2528,0	758,4	0,0	0,0	0,0	0,0	1625,8	487,7
Eluato 3	300	12	25	5,0	12,6	0,4	577,8	173,3	0,0	0,0	56,8	17,0	335,6	100,7
Eluato 4	300	12	25	5,0	12,6	0,1	131,0	39,3	0,0	0,0	20,9	6,3	81,5	24,5
Eluato 5	300	12	25	5,0	12,6	0,1	38,5	11,6	0,0	0,0	8,8	2,6	23,6	7,1

Regeneración: 50 % etanol, 45°C, pH 12

Regenerado 1	600	24	25,0	5,0	12,6		21,2	12,7	0,0	0,0	9,6	5,8	12,1	7,3
-----------------	-----	----	------	-----	------	--	------	------	-----	-----	-----	-----	------	-----

Regeneración: Citrato de sodio 10% / agua, ambos 45°C

Regenerado 2	600	24	25		12,4		4,0	2,4	0,0	0,0	2,4	1,4	2,3	1,4
Regenerado 3	600	24	25		11,4		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabla I.5:

Prueba de columna con respecto a la estabilidad del material de la columna

Elución después de 14 días de almacenamiento, 25°C

Agente de adsorción: XAD 7, volumen = 300 ml

Solución de partida: orina nativa de Polonia, ultrafiltrada

Muestras	Vol. ml	Tiempo min	Flujo ml/min	Flujo VL/h	pH	SS %	Estrona mg/l	Estrona mg	HPMF mg/l	HPMF mg	Cresol mg/l	Cresol mg	Equilina mg/l	Equilina mg
<u>Solución de partida:</u> 90 l cargados a una columna de 3L (Tabla I.1, Resina distribuida en 10 partes de 300 ml)														
Contenido de partida	7700						113,6	874,7	89,7	590,7	965,3	7432,8	66,8	514,4
<u>Lavado:</u> Agua con NaOH (2%), pH 13														
Lavado 1	300	12	25	5,0	9,3		25,9	7,8	502,5	150,8	6000,0	1800,0	130,0	39,0
Lavado 2	300	12	25	5,0	13,0		65,5	19,7	130,1	39,0	2188,5	656,6	53,4	16,0
Lavado 3	300	12	25	5,0	13,1		8,6	2,6	26,8	8,0	707,3	212,2	10,0	3,0
Lavado 4	300	12	25	5,0	13,1		7,2	2,2	5,2	1,6	76,1	22,8	3,3	1,0
Lavado 5	300	12	25	5,0	13,1		7,6	2,3	0,0	0,0	32,2	9,7	4,5	1,4
<u>Elución:</u> Etanol 30%, 45°C, pH 12														
Eluato 1	300	12	25	5,0	13,1	3,5	170,5	51,2	3,7	1,1	55,8	16,7	97,3	29,2
Eluato 2	300	12	25	5,0	13,0	1,6	1586,2	475,9	3,7	1,1	0,0	0,0	927,0	278,1
Eluato 3	300	12	25	5,0	12,5	0,6	807,0	242,1	0	0,0	0,0	0,0	499,3	149,8
Eluato 4	300	12	25	5,0	12,5	0,3	325,4	97,6	1,2	0,4	41,8	12,5	214,0	64,2
Eluato 5	300	12	25	5,0	12,4	0,2	175,9	52,8	0,5	0,2	22,7	6,8	106,6	32,0
<u>Regeneración:</u> 50 % etanol, 45°C, pH 12														
Regenerado 1	600	24	25,0	5,0	12,4		163,6	98,2	1,1	0,7	25,4	15,2	99,1	59,5
<u>Regeneración:</u> Citrato de sodio 10% / agua, ambos 45°C														
Regenerado 2	600	24	25		11,7		24,5	14,7	0,0	0,0	6,9	4,1	14,7	8,8
Regenerado 3	600	24	25		10,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabla I.6:

Prueba de columna con respecto a la estabilidad del material de la columna
Elución después de 35 días de almacenamiento, 4°C
Agente de adsorción: XAD 7, volumen = 300 ml
Solución de partida: orina nativa de Polonia, ultrafiltrada

Muestras	Vol. ml	Tiempo min	Flujo ml/min	Flujo VL/h	pH	SS %	Estrona mg/l	Estrona mg	HPMF mg/l	HPMF mg	Cresol mg/l	Cresol mg	Equilina mg/l	Equilina mg
----------	------------	---------------	-----------------	---------------	----	---------	-----------------	---------------	--------------	------------	----------------	--------------	------------------	----------------

Solución de partida: 90 l cargados a una columna de 3L (Tabla I.1, Resina distribuida en 10 partes de a 300 ml)

Contenido de partida	7700						113,6	874,7	89,7	690,7	965,3	7432,8	66,8	514,4
-------------------------	------	--	--	--	--	--	-------	-------	------	-------	-------	--------	------	-------

Lavado: Agua con NaOH (2%), pH 13

Lavado 1	300	12	25	5,0	9,2		89,6	26,9	76,4	22,9	1687,2	506,2	64,0	19,2
Lavado 2	300	12	25	5,0	13,0		48,9	14,7	16,9	5,1	6157,1	1847,1	176,2	52,9
Lavado 3	300	12	25	5,0	13,1		9,2	2,8	40,5	12,2	899,7	269,9	13,5	4,1
Lavado 4	300	12	25	5,0	13,1		8,9	2,7	3,0	0,9	96,8	29,0	6,9	2,1
Lavado 5	300	12	25	5,0	13,0		7,6	2,3	0,0	0,0	42,0	12,6	4,3	1,3

Elución: Etanol 30%, 45°C, pH 12

Eluato 1	300	12	25	5,0	13,0	3,6	73,3	22,9	5,4	1,6	62,1	18,6	38,9	11,7
Eluato 2	300	12	25	5,0	12,7	2,0	2437,2	731,2	0,0	0,0	147,1	44,1	1386,8	416,0
Eluato 3	300	12	25	5,0	12,3	0,5	769,5	230,9	0,0	0,0	69,0	20,7	438,8	131,6
Eluato 4	300	12	25	5,0	12,6	0,3	223,5	67,1	1,3	0,4	52,6	15,8	126,6	38,0
Eluato 5	300	12	25	5,0	12,5	0,1	66,7	20,0	0,0	0,0	20,6	6,2	39,8	11,9

Regeneración: 50 % etanol, 45°C, pH 12

Regenerado 1	600	24	25,0	5,0	12,4		15,5	9,3	0,0	0,0	14,3	8,6	15,3	9,2
-----------------	-----	----	------	-----	------	--	------	-----	-----	-----	------	-----	------	-----

Regeneración: Citrato de sodio 10% / agua, ambos 45°C

Regenerado 2	600	24	25		12,0		1,4	0,8	0,0	0,0	7,5	4,5	1,1	0,7
Regenerado 3	600	24	25		10,9		0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,5	0,0	0,0

Tabla I.7:

Prueba de columna con respecto a la estabilidad del material de la columna

Elución después de 35 días de almacenamiento, 25°C

Agente de adsorción: XAD 7, volumen = 300 ml

Solución de partida: orina nativa de Polonia, ultrafiltrada

Muestras	Vol. ml	Tiempo min	Flujo ml/min	Flujo VL/h	pH	SS %	Estrona mg/l	Estrona mg	HPMF mg/l	HPMF mg	Cresol mg/l	Cresol mg	Equilina mg/l	Equilina mg
----------	------------	---------------	-----------------	---------------	----	---------	-----------------	---------------	--------------	------------	----------------	--------------	------------------	----------------

Solución de partida: 90 l cargados a una columna de 3L (Tabla I.1, Resina distribuida en 10 partes de 300 ml)

Contenido de partida	7700						113,6	874,7	89,7	690,7	965,3	7432,8	66,8	514,4
-------------------------	------	--	--	--	--	--	-------	-------	------	-------	-------	--------	------	-------

Lavado: Agua con NaOH (2%), pH 13

Lavado 1	300	12	25	5,0	9,2		68,8	20,6	91,6	27,5	1595,4	478,6	34,5	10,4
Lavado 2	300	12	25	5,0	13,0		46,6	14,0	17,0	5,1	6050,3	1815,1	151,6	45,5
Lavado 3	300	12	25	5,0	13,1		8,8	2,6	3,6	1,1	1168,2	350,5	14,2	4,3
Lavado 4	300	12	25	5,0	13,1		7,9	2,4	11,7	3,5	351,1	105,3	5,4	1,6
Lavado 5	300	12	25	5,0	13,1		8,0	2,4	0,0	0,0	134,4	40,3	4,7	1,4

Elución: Etanol 30%, 45°C, pH 12

Eluato 1	300	12	25	5,0	13,0	3,5	118,4	35,5	7,5	2,3	101,2	30,4	64,8	19,4
Eluato 2	300	12	25	5,0	12,9	1,6	1525,9	457,8	0,0	0,0	199,2	59,8	811,4	243,4
Eluato 3	300	12	25	5,0	12,6	0,7	987,7	296,3	0,0	0,0	139,1	41,7	512,4	153,7
Eluato 4	300	12	25	5,0	12,4	0,3	479,4	143,8	2,2	0,7	71,1	21,3	251,5	75,5
Eluato 5	300	12	25	5,0	12,3	0,3	241,0	72,3	0,0	0,0	22,5	6,8	125,7	37,7

Regeneración: 50 % etanol, 45°C, pH 12

Regenerado 1	600	24	25,0	5,0	12,3		110,9	66,5	1,5	0,9	15,9	9,5	58,3	35,0
-----------------	-----	----	------	-----	------	--	-------	------	-----	-----	------	-----	------	------

Regeneración: Citrato de sodio 10% / agua, ambos 45°C

Regenerado 2	600	24	25		11,9		9,6	5,8	0,0	0,0	6,7	4,0	5,6	3,4
Regenerado 3	600	24	25		10,0		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabla I.8:
Prueba de columna con respecto a la estabilidad del material de la columna
Elución después de 56 días de almacenamiento, 4°C
Agente de adsorción: XAD 7, volumen = 300 ml
Solución de partida: orina nativa de Polonia, ultrafiltrada

Muestras	Vol. ml	Tiempo min	Flujo ml/min	Flujo VL/h	pH	SS %	Estrona mg/l	Estrona mg	HPMF mg/l	HPMF mg	Cresol mg/l	Cresol mg	Equilina mg/l	Equilina mg
Solución de partida: 90 l cargados a una columna de 3L (Tabla I.1, Resina distribuida en 10 partes de a 300 ml)														
Contenido de partida	7700						113,6	874,7	89,7	690,7	965,3	7432,8	66,8	514,4
Lavado: Agua con NaOH (2%), pH 13														
Lavado 1	300	12	25	5,0	9,2		85,8	25,7	44,5	13,4	1171,3	351,4	44,6	13,4
Lavado 2	300	12	25	5,0	13,0		74,8	22,4	457,2	137,2	5000,0	1500,0	113,5	34,1
Lavado 3	300	12	25	5,0	13,1		9,6	2,9	34,1	10,2	702,2	210,7	7,5	2,3
Lavado 4	300	12	25	5,0	13,2		8,9	2,7	4,3	1,3	63,5	19,1	4,0	1,2
Lavado 5	300	12	25	5,0	13,1		8,9	2,7	0,0	0,0	23,9	7,2	3,7	1,1
Elución: Etanol 30%, 45°C, pH 12														
Eluato 1	300	12	25	5,0	13,1	3,8	53,1	15,9	3,3	1,0	41,7	12,5	27,6	8,3
Eluato 2	300	12	25	5,0	12,8	2,0	2289,1	686,7	5,8	1,7	0,0	0,0	1288,2	386,5
Eluato 3	300	12	25	5,0	12,4	0,5	869,4	260,8	0,0	0,0	0,0	0,0	475,9	142,8
Eluato 4	300	12	25	5,0	12,3	0,2	228,2	68,5	2,4	0,7	0,0	0,0	122,0	36,6
Eluato 5	300	12	25	5,0	12,3	0,1	83,4	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,2	13,6
Regeneración: 50 % etanol, 45°C, pH 12														
Regenerado 1	600	24	25,0	5,0	12,2		42,4	25,4	3,0	1,8	0,0	0,0	22,9	13,7
Regeneración: Citrato de sodio 10% / agua, ambos 45°C														
Regenerado 2	600	24	25		11,8		3,1	1,9	0,0	0,0	2,2	1,3	1,5	0,9
Regenerado 3	600	24	25		10,8		1,1	0,7	0,9	0,5	0,2	0,1	0,7	0,4

Tabla I.9:

Prueba de columna con respecto a la estabilidad del material de la columna
 Elución después de 56 días de almacenamiento, 4°C
 Agente de adsorción: XAD 7, volumen = 300 ml
 Solución de partida: orina nativa de Polonia, ultrafiltrada

Muestras	Vol. ml	Tiempo min	Flujo ml/min	Flujo VL/h	pH	SS %	Estrona mg/l	Estrona mg	HPMF mg/l	HPMF mg	Cresol mg/l	Cresol mg	Equilina mg/l	Equilina mg
Solución de partida: 90 l cargados a una columna de 3L (Tabla I.1, Resina distribuida en 10 partes de 300 ml)														
Contenido de partida	7700						113,6	874,7	89,7	690,7	965,3	7432,8	66,8	514,4
Lavado: Agua con NaOH (2%), pH 13														
Lavado 1	300	12	25	5,0	9,2		85,8	25,7	44,5	13,4	1171,3	351,4	44,6	13,4
Lavado 2	300	12	25	5,0	13,0		74,8	22,4	457,2	137,2	5000,0	1500,0	113,5	34,1
Lavado 3	300	12	25	5,0	13,1		9,6	2,9	34,1	10,2	702,2	210,7	7,5	2,3
Lavado 4	300	12	25	5,0	13,2		8,9	2,7	4,3	1,3	63,5	19,1	4,0	1,2
Lavado 5	300	12	25	5,0	13,1		8,9	2,7	0,0	0,0	23,9	7,2	3,7	1,1
Elución: Etanol 30%, 45°C, pH 12														
Eluato 1	300	12	25	5,0	13,1	3,8	53,1	15,9	3,3	1,0	41,7	12,5	27,6	8,3
Eluato 2	300	12	25	5,0	12,8	2,0	2289,1	686,7	5,8	1,7	0,0	0,0	1288,2	386,5
Eluato 3	300	12	25	5,0	12,4	0,5	869,4	260,8	0,0	0,0	0,0	0,0	475,9	142,8
Eluato 4	300	12	25	5,0	12,3	0,2	228,2	68,5	2,4	0,7	0,0	0,0	122,0	36,6
Eluato 5	300	12	25	5,0	12,3	0,1	83,4	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	45,2	13,6
Regeneración: 50 % etanol, 45°C, pH 12														
Regenerado 1	600	24	25,0	5,0	12,2		42,4	25,4	3,0	1,8	0,0	0,0	2,29	13,7
Regeneración: Citrato de sodio 10% / agua, ambos 45°C														
Regenerado 2	600	24	25		11,8		3,1	1,9	0,0	0,0	2,2	1,3	1,5	0,9
Regenerado 3	600	24	25		10,8		1,1	0,7	0,9	0,5	0,2	0,1	0,7	0,4

Tabla I.10
Resumen de los resultados de las pruebas de estabilidad de la columna

	Carga	Cartucho	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8
<u>Carga</u>										
Estrona (mg)	10221	874,7	874,7	874,7	874,7	874,7	874,7	874,7	874,7	874,7
Equilina (mg)	6009	514,4	514,4	514,4	514,4	514,4	514,4	514,4	514,4	514,4
<u>Almacenamientos</u>										
Temperatura	---	TA	25	4	25	4	25	4	25	4
Duración (d)	---	---	7	7	14	14	35	35	56	56
<u>Lavado</u>										
Estrona (mg)	---	48,9	44,9	45,2	34,6	39,1	42	49,4	49,9	56,4
Equilina (mg)	---	44,3	39,5	34,4	60,4	64,4	63,2	79,6	44,5	52,1
<u>Elución</u>										
Estrona (mg)	La resina se retiró. Se distribuyó en 10 porciones		1014,1	897,1	926,8	919,6	1006,5	1005,7	1071,2	1087
Equilina (mg)			578,4	512,7	536,7	553,3	633,7	529,7	609,2	536,8
Regeneración										
Estrona (mg)			26,0	126,5	114,3	112,9	15,1	72,3	10,1	10,2
Equilina (mg)			13,8	67,6	57,7	68,3	8,7	38,4	9,9	6,0
Suma elución + Regeneración										
Estrona			1040,1	1023,6	1041,1	1032,5	1021,6	1078,0	1081,3	1097,2
Equilina			592,2	580,3	594,4	5601,3	642,4	568,1	619,1	542,8

ES 2 266 221 T3

Ejemplo 3

Pruebas de estabilidad con columnas de adsorción cargadas para determinar el número de gérmenes

- 5 La calidad e inocuidad microbiológica de los materiales de partida naturales para la producción de preparaciones farmacéuticas se vuelve cada vez más importante en los últimos tiempos. Por este motivo se llevaron a cabo análisis para determinar el número de gérmenes en las muestras después de un almacenamiento de las columnas de cinco y ocho semanas, de acuerdo con procedimientos habituales (Farmacopea).
- 10 Los resultados de las determinaciones del número de gérmenes se reproducen en la Tabla II. El número total de gérmenes para una temperatura de almacenamiento de 4°C se debe calificar de pequeño. Para la temperatura de almacenamiento de 25°C el agua de lavado de la columna tiene de 1,2 a 4,6 x 10⁶ gérmenes, en la sustancia eluida se encontraron 80 a 170 gérmenes. Sin embargo hay que hacer notar que las adsorciones de las columnas almacenadas no se lavaron ni se conservaron previamente, o sea, que desde el principio estaban expuestas a un mayor riesgo de
- 15 formación de gérmenes. Por consiguiente, en el caso del almacenamiento sin refrigeración es recomendable que las columnas cargadas se laven a conciencia al menos con agua, pero convenientemente, además, con soluciones de lavado adicionalmente estabilizantes y conservantes, por ejemplo solución de cloruro de sodio.

20

TABLA II

Pruebas de estabilidad para determinar el número de gérmenes

25

	Tiempo de almacenamiento 5 semanas		Tiempo de almacenamiento 8 semanas	
Tiempo de almacenamiento a °C	4°C	25°C	4°C	25°C
Agua de lavado de la columna	200	4.6* 10 ⁶	150	1.2* 10 ⁶
Agua de lavado básica	< 1	18	3	14
Eluato etanólico	20	80	3.5	170

30

* Especificaciones en KBE/ml
(KBE = unidades formadoras de colonias)

35

Ejemplo 4

40

Pruebas de estabilidad con columnas de adsorción cargadas, congeladas

45

En función de la estación del año y/o de la región pueden presentarse temperaturas por debajo del punto de congelación durante el almacenamiento o durante el transporte de columnas o, respectivamente, cartuchos cargados, con la consecuencia indeseada de que el contenido acuoso de las columnas o, respectivamente, cartuchos, se solidifica. Las pruebas correspondientes permiten suponer que el proceso de congelación parece tener un efecto negativo sobre la elución de las columnas o, respectivamente, cartuchos vueltos a descongelar. Siempre que no sea posible llevar a cabo un atemperado de la columna, o siempre que tenga lugar un almacenamiento a bajas temperaturas se recomienda que, para impedir el congelamiento, el último lavado se lleve a cabo con mezclas frigoríficas adecuadas en lugar de agua.

50

A) Ejecución de la prueba

55

De la multitud de posibles mezclas frigoríficas de las cuales para aclaración se especifican algunas como ejemplo en la Tabla III.1, se recurrió como ejemplo para otros experimentos a una solución de cloruro de sodio. En el caso de una adición de 23 g de NaCl por 100 g de agua, el punto de congelamiento se encuentra a -21°C.

60

La carga de la columna se llevó a cabo de la manera habitual. Después de terminar la carga con orina se llevó a cabo un lavado con 3 volúmenes de lecho de agua, después con 2 volúmenes de lecho de una solución de NaCl al 33% en peso. A continuación, la columna se almacenó durante 9 días a -19°C en un arcón congelador.

65

ES 2 266 221 T3

TABLA III.1

Ejemplos de mezclas acuosas fluidas salinas y frigoríficas

5	Temp. alcanzable en °C	Sustancia A	[g de A/100 g de agente frigorífico]	Sustancia B
	-3,4	NH ₄ Cl	23	Agua
10	-5,3	NaNO ₃	43	Agua
	-7,8	BaCl ₂	22	Hielo
15	-10	NaCl	26	Agua
	-12	CaCl ₂ x 6 H ₂ O	71	Agua
	-16	NH ₄ SCN	57	Agua
20	-19	(NH ₄) ₂ SO ₄	38	Hielo
	-21	NaCl	23	Hielo
25	-22	CaCl ₂ x 6 H ₂ O	45	Hielo
	-28	NaBr	39	Hielo
	-33	MgCl ₂	22	Hielo
30	-37	H ₂ SO ₄ al 66%	48	Nieve
	-40	CaCl ₂ x 6 H ₂ O	55	Hielo
35	-55	CaCl ₂ x 6 H ₂ O	59	Hielo

B) Resultados

40 Incluso después de 9 días de almacenamiento a -19°C el contenido de la columna permaneció fluido, y esto sin indicaciones de una posible solidificación parcial. El acondicionamiento de la columna, es decir, el lavado básico, elución y regeneración transcurrió de manera normal. El contenido total de hormona por SS fue de aproximadamente 22% en peso. Los resultados se representan en la Tabla III.2.

45 No se pudieron detectar efectos negativos del elevado contenido en NaCl sobre el contenido en CE y la separación de cresol y HPMF. En resumen, se puede determinar por lo tanto, que la estabilización de las columnas o, respectivamente, los cartuchos cargados con orina, con una mezcla frigorífica líquida, por ejemplo, una solución acuosa de cloruro de sodio y un almacenamiento a temperaturas inferiores a la de congelación, por ejemplo de hasta -20°C, incluso durante períodos de tiempo de 1,5 a 2 semanas tiene un efecto positivo. El contenido de la columna o, respectivamente, del cartucho permanece fluido, el acondicionamiento de las columnas o, respectivamente, los cartuchos para aislar el CE mediante lavado, elución y regeneración transcurre normal. No se pudieron encontrar resultados negativos incluso con elevados contenidos en NaCl.

55

60

65

Tabla III.2:

Prueba de columna con respecto a la estabilidad del material de la columna
 Elución después de 9 días de almacenamiento, -19.1°C
 Agente de adsorción: XAD 7, volumen = 200 ml

Muestras	Vol. l	Tiempo min	Flujo ml/min	Flujo VL/h	pH	SS %	Cresol mg/l	Cresol mg	Equilina mg/ml	Equilina mg	Estrona mg/ml	Estrona mg	HPMF mg/l	HPMF mg	Estrona SS %
Solución de partida: 7 l cargados a una columna de 3L = 35 volúmenes de lecho															
Desague 1	1	62	16,1	4,8			61	61	0		0		0		
Desague 2	1	61	16,4	4,9			96	96	0		0		0		
Desague 3	1	62	16,1	4,8			111	111	0		0		0		
Desague 4	1	61	16,4	4,9			111	111	0		0		6		
Desague 5	1	61	16,4	4,9			275	275	0		0		28		
Desague 6	1	61	16,4	4,9			267	267	0		0		27		
Desague 7	1	61	16,4	4,9			392	392	0		0		32		
Enjuague: Agua y solución de NaCl al 33%, para almacenar a -19.1 °C															
Con agua	0,6	36	16,7	5,0			646	388	0		0		88		
Con solución salina	0,4	25	16,0	4,8			465	186	0		0		5		
Lavado: Agua con NaOH (2%), pH 13															
Lavado 1	0,2	12	16,7	5,0			70	14	0		0		0	0	
Lavado 2	0,2	11	18,2	5,5			20038	4008	0		70	14	348	1898	
Lavado 3	0,2	11	18,2	5,5			4009	802	32		15	3	114	622	
Lavado 4	0,2	11	18,2	5,5			287	57	10	2	0	0	31		
Lavado 5	0,2	11	18,2	5,5			89	18	9	2	0	0	11		
Elución: Etanol 30%, 45°C, pH 12															
Eluato 1	0,2	12	16,7	5,0	12,1	4,1	81	16	13	3	8	2	5	25	0,02
Eluato 2	0,2	12	16,7	5,0	13,3	2,5	266	53	1135	227	2036	407	0	0	8,14
Eluato 3	0,2	11	18,2	5,5	12,6	0,5	114	23	493	99	854	171	0	0	17,08
Eluato 4	0,2	11	18,2	5,5	12,4	0,1	62	12	32	6	85	17	4	22	8,50
Eluato 5	0,2	12	16,7	5,0	12,4	0,1	24	5	8	2	17	3	2	10	1,70
Regeneración: 50 % etanol, 45°C, pH 12															
Regenerado 1	0,4	24	16,7	5,0			14,0		n.c.		n.c.		n.c.		
Regeneración: Citrato de sodio 10% / agua, ambos 45°C															
Regenerado 2	0,4	24	16,7	5,0			13,0		n.c.		n.c.		n.c.		
Regenerado 3	0,4	24	16,7	5,0			n.c.		n.c.		n.c.		n.c.		

Ejemplo 5

Concentración y estabilización de orina en la prueba práctica

A) Generalidades

En una prueba práctica se debía demostrar que con un contenido suficiente de hormonas en la orina no sólo se pueden obtener buenos resultados en el laboratorio sino también bajo condiciones de producción. Se llevó a cabo una prueba como puede desarrollarse en campañas de recolección en cualquier lugar.

B) Ejecución de la prueba

Se recolectó orina fresca de calidad suficiente en un acaballadero. Con tres caballos y 15 a 20 l de orina/día se obtuvieron en 10 días un total de 150 a 200 l. Para la adsorción se eligió por consiguiente una columna de adsorción de 5 l.

La carga diaria con orina, excepto el fin de semana, se llevó a cabo en la prueba de acuerdo al esquema siguiente:

Inicio de la recolección de orina durante el fin de semana

Lunes: Aporte de la orina del sábado, domingo y lunes

Martes a viernes: Aporte de la orina del respectivo día

Lunes: Aporte de la orina del sábado, domingo y lunes

Martes: Elución

El aporte de la orina con una velocidad de carga de aproximadamente 4,5 volúmenes de lecho/h se llevó a cabo directamente a la columna, únicamente una bujía de algodón con límite de separación de 20 μm sirvió como filtro previo. Entre los aportes individuales no se llevó a cabo un lavado con agua para dificultar las condiciones. En pruebas previas se pudieron pasar hasta 450 l de orina a través de una bujía de algodón sin pérdidas de presión. Sin embargo, en esta prueba práctica la filtración resultó ser difícil en virtud de un contenido inesperadamente alto de sedimento de carbonato de calcio y/o mucinas. Después de respectivamente 40 a 50 l se produjo un bloqueo con un aumento de la presión hasta aproximadamente 4 bar, el cual hacía necesario un cambio de filtro. En función del contenido de carbonato de calcio y/o mucinas se recomienda, por consiguiente, eventualmente la adición de coadyuvantes de filtración.

A pesar de que la bujía dejó pasar porciones de sedimento > 20 μm , no se produjo un taponamiento de la columna de adsorción.

C) Resultados

Contenidos de hormonas

Los resultados de esta prueba práctica se reproducen en la Tabla IV.

Los contenidos en estrona y equilina de la orina bruta fueron satisfactoriamente elevados con 123 mg/l y, respectivamente, 74 mg/l, y corresponden a una orina de calidad mediana a buena. Sin embargo, fueron inesperadamente altos los valores de cresol con 531 mg/l en la orina reciente, los cuales no se habían observado hasta ahora. En este caso desempeña un papel la cuestión de la alimentación y requiere ser tenida en cuenta. Aunque fundamentalmente se pueden controlar, por ejemplo, mayores contenidos en cresol, en el caso individual si pueden provocar dificultades. Por consiguiente, puede ser necesario prolongar el proceso de lavado alcalino durante el acondicionamiento para minimizar los valores de cresol en la sustancia etanólica eluida. Por lo demás, la adsorción y la desorción transcurrieron como de costumbre. En la sustancia eluida se obtuvo un transcurso bien marcado para la estrona y la equilina. En las sustancias eluidas 2 y 3 se hallaron más de 95% de estrona/equilina. Con relación al contenido en SS, el contenido total de hormona es de aproximadamente 30% en peso. Con ello se satisfizo la expectativa que se esperaba de la prueba y, bajo condiciones de prueba difíciles, se obtuvo una excelente concentración hasta un contenido en hormona/SS > 15% en peso.

Tabla IV.1.1:

Prueba práctica para la estabilización y concentración de CE

Días de prueba: 1-10, carga de la columna (en 7 días laborables)

Agente de adsorción: XAD 7, volumen = 5 l

Solución de partida: orina nativa, sin tratar

La columna funciona de abajo hacia arriba.

Muestras	Vol. l	Tiempo min	Flujo ml/min	Flujo VL/h	pH	SS %	Estrona mg/l	Estrona mg	Cresol mg/l	Cresol mg	Equilina mg/l	Equilina mg	HPMF mg/l	Estrona /SS %
----------	-----------	---------------	-----------------	---------------	----	---------	-----------------	---------------	----------------	--------------	------------------	----------------	--------------	------------------

Solución de partida: 140 l cargados a una columna de 5L, = 28 volúmenes de lecho (cantidad total de 7 cargas individuales)

Contenido de partida	140				9,0	6	112,5		531,1		37,4		42,5	
----------------------	-----	--	--	--	-----	---	-------	--	-------	--	------	--	------	--

Carga: Agua con NaOH (2%), pH 13

Desague 1	10	26	384,6	4,6			0		0,0	0	0		0	
Desague 2	10	27	370,4	4,4			0		249	2490	0		0	
Desague 3	10	27	370,4	4,4			0		245	2450	0		0	
Desague 4	10	28	357,1	4,3			0		408	4080	0		0	
Desague 5	10	27	370,4	4,4			0		358	3580	0		0	
Desague 6	10	23	434,8	5,2			0		537	5370	0		0	
Desague 7	10	29	344,8	4,1			0		901	9010	0		0	
Desague 8	10	29	344,8	4,1	8,7		0		836	8360	0		0	
Desague 9	10	29	344,8	4,1			0		581	5810	0		0	
Desague 10	10	24	416,7	5,0			0		605	6050	0		0	
Desague 11	10	25	400,0	4,8			0		621	6210	0		0	
Desague 12	10	27	370,4	4,4			0		509	5090	0		0	
Desague 13	10	27	370,4	4,4			0		668	6680	0		0	
Desague 14	10	24	416,7	5,0			0		655	6550	0		0	

Tabla IV.2:

Prueba práctica para la estabilización y concentración de CE

Acondicionamiento de la columna en el 11. día de la prueba

Agente de adsorción: XAD 7, volumen = 5 l

Solución de partida: orina nativa, sin tratar

La columna funciona de abajo hacia arriba

Muestras	Vol. l	Tiempo min	Flujo ml/min	Flujo VL/h	pH	SS %	Estrona mg/l	Estrona mg	Cresol mg/l	Cresol mg	Equilina mg/l	Equilina mg	HPMF mg/l	Estrona /SS %
Contenido de partida	140				9,0	6	112,5		531,1		37,4		42,5	
Lavado: Agua con NaOH (2%), pH 13														
Lavado 1	5	15	333,3	4,0				0	1104	5520	0		40	
Lavado 2	5	15	333,3	4,0				0	4400	22000	0		252	
Lavado 3	5	14	357,1	4,3				0	2355	11775	0		60	
Lavado 4	5	14	357,1	4,3				0	40	200	0		0	
Lavado 5	5	14	357,1	4,3				0	7	35	0		0	
Elución: Etanol 30%, 45°C, pH 12														
Eluato 1	5	8	625,0	7,5		3,8	23	115	12	60	9	45	0	0,1
Eluato 2	5	10	500,0	6,0		2,0	2797	13985	201	1005	1211	6055	0	14,0
Eluato 3	5	12	416,7	5,0		0,3	481	2405	0	0	193	965	0	16,0
Eluato 4	5	13	384,6	4,6		0,0	14	70	0	0	7	35	0	
Eluato 5	5	13	384,6	4,6		0,0	0	0	0	0	0	0	0	
Regeneración: 50 % etanol, 45°C, pH 12														
Regenerado 1	10	24	0,4	0,0	12,2		0		0		0		0	
Regeneración: Citrato de sodio 10% / agua, ambos 45°C														
Regenerado 2	10	24	0,4	0,0	11,3		0		0		0		0	
Regenerado 3	10	24	0,4	0,0	10,1		0		0		0		0	
Regenerado 4	Se pasaron 2 VL (volúmenes de lecho) de abajo hacia arriba													

ES 2 266 221 T3

Número de gérmenes

Adicionalmente a la adsorción de orina se analizó una posible contaminación con gérmenes bacterianos de la columna. Con las presentes condiciones:

1. Aporte de orina bruta contaminada (no se separan gérmenes mediante la filtración con la bujía de algodón)
2. No se efectúa lavado después del aporte diario
3. La prueba se lleva a cabo a la temperatura ambiente
4. Duración de la prueba de 10 días

no era posible excluir la posibilidad de una colonización de gérmenes en la columna y un subsiguiente crecimiento de los gérmenes. Una determinación del número total de gérmenes en diversas etapas de la adsorción arrojó el resultado siguiente:

Muestra	Cantidad total de gérmenes/ml
Orina bruta	$1,1 \cdot 10^8$
Agua de lavado de la columna después de 10 días	$1,1 \cdot 10^8$
Agua de lavado básica	< 1
Sustancia eluida principal	1,5

D) Resumen de los resultados

A lo largo de un período de prueba de 10 días se aportó orina fresca diariamente a una columna de adsorción de 5 l. El volumen total de orina fue de 140 l con un contenido medio de estrona y equilina de 123 mg/l y, respectivamente, 74 mg/l.

Se prescindió intencionadamente de un lavado de columna con agua después de la adsorción diaria de orina. En ambas sustancias eluidas principales, que se obtuvieron de forma muy marcada, se hallaron aproximadamente 93% de estrona y, respectivamente, equilina. El contenido total de hormonas de la sustancia eluida con relación a la SS fue de aproximadamente 30% en peso. Otro resultado sorprendente se refiere a una imaginable contaminación de la columna con gérmenes. Aquí, a pesar del aporte de orina bruta altamente contaminada con gérmenes no se pudo detectar un crecimiento de gérmenes en la columna incluso después de 10 días. La sustancia eluida resultante estaba casi libre de gérmenes con 1,5 gérmenes/ml. Bajo condiciones difíciles se demostró con ello, a mayor escala, que con un contenido de hormonas suficiente en la orina bruta, con una columna adsorbente se puede realizar con buena calidad una estabilización y concentración a un contenido de hormona/SS superior a 15%.

Ejemplo 6

Pruebas de filtración con bujías filtrantes

En una prueba práctica adicional se llevaron a cabo pruebas de filtración con filtros de bujía, cuyos resultados se pueden resumir como sigue:

Material utilizado: orina reciente (procedente de un acaballadero alemán)

La orina de yeguas preñadas parcialmente removida, reunida en barriles, se trasegó a un contenedor desde los barriles mediante una bomba de manguera a través de una saco de 5μ (filtro previo). En el contenedor quedó un sedimento de aproximadamente 0,5% en peso. Una representación esquemática de la forma de proceder para la filtración de la orina bruta se reproduce en la Fig. 2.

1ª Prueba

Saco	5μ
Filtros de bujía	5μ , 3μ , 1μ conectados en serie
Bujías absolutas	$2 \times 1,2\mu$ conectadas en paralelo
Carga de la columna	95 l de filtrado
Sedimento de filtrado	0,000%

ES 2 266 221 T3

2ª Prueba

5	Saco	5 μ
	Filtros de bujía	5 μ , 3 μ , 1 μ conectados en serie
	Bujías absolutas	2 x 3 μ conectadas en paralelo
	Carga de la columna	142 l de filtrado
	Sedimento de filtrado	0,001%

10 3ª Prueba

15	Saco	5 μ
	Filtros de bujía	3 μ , 1 μ conectados en serie
	Bujías absolutas	2 x 1 μ conectadas en paralelo
	Carga de la columna	160 l de filtrado
	Sedimento de filtrado	0,000%

20 Por cada prueba se tomó una muestra corriente abajo de la bujía absoluta (filtro de membrana). Cada 100 l se tomó una muestra del desagüe, después de la columna.

Carga total de la columna: 397 l de filtrado

25 El contenido de sólidos (SS) después del acondicionamiento era de 5,9% en peso.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la concentración y estabilización descentralizada acorde con la práctica de mezclas de estrógenos conjugados (CE) de la orina de yeguas preñadas (PMU), el cual se **caracteriza** porque

- la mezcla natural de estrógenos conjugados (CE) contenida en la orina de yeguas preñadas (PMU) se concentra y estabiliza en un soporte sólido (= adsorbente), de manera que

- una cantidad total máxima preestablecida de un líquido de orina recolectado, eventualmente depurado mecánicamente con anterioridad de manera burda, se bombea de forma continua o en cantidades parciales discretas desde un recipiente de depósito, a una velocidad de flujo preestablecida, a través de un cartucho colocado en posición vertical, y el líquido de orina que fluye al exterior se desecha, de manera que

- el cartucho está repleto de un agente de adsorción adecuado, rodeado de líquido, para la adsorción de una cantidad predefinida de la mezcla de estrógenos conjugados contenida en el líquido de la orina, y de manera que

- la cantidad total máxima del líquido de orina bombeado a través del cartucho, preestablecida como punto de control final para la carga del agente de adsorción, se ajusta a la capacidad máxima de carga del agente de adsorción para los estrógenos conjugados (CE) contenidos en el líquido de la orina.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las dimensiones internas del cartucho para el lecho de agente de adsorción se calculan de tal modo que el cartucho pueda alojar 30 a 50 l de agente de adsorción, y que la orina de las yeguas preñadas deba recorrer un trecho de 80 a 120 cm desde la entrada hasta la salida.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el cartucho utilizado en el procedimiento se compone de vidrio de laboratorio resistente a los golpes, material sintético y/o metal.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque como bomba se emplea una monobomba, una bomba de manguera o una bomba de membrana.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque como contador volumétrico se emplea un rotámetro con flotador, un contador volumétrico con aspas rotatorias o un contador volumétrico inductivo.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque para la medición de la cantidad de líquido de orina bombeado a través del cartucho se emplea un medidor de cantidades de paso, de preferencia un contador de agua o un medidor de cantidades de paso.

7. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la velocidad de flujo (velocidad de carga) se encuentra en el intervalo de 3 a 10 volúmenes de lecho de agente de adsorción/h, preferentemente 4 a 6 volúmenes de lecho de agente de adsorción/h.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque como agente de adsorción se emplean resinas adsorbentes polímeras, gel de sílice o gel de sílice-RP (de fase inversa), en particular resinas adsorbentes polímeras, preferentemente resinas adsorbentes polímeras semipolares.

9. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la cantidad máxima total de líquido de orina es de 20 a 60 volúmenes de lecho de agente de adsorción, preferentemente 30 a 40 volúmenes de lecho de agente de adsorción.

10. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el cartucho después de la carga del agente de adsorción con una cantidad de PMU que corresponde aproximadamente a la capacidad total del agente de adsorción, o incluso también antes de alcanzar la capacidad total de carga, después de etapas individuales de carga parcial arbitrarias, se lava con agua y/u otra solución de lavado acuosa adecuada.

11. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el cartucho después de la carga del agente de adsorción, en caso deseado se lava primero con agua y/o alguna otra solución de lavado acuosa adecuada y, finalmente, para una estabilización adicional, con una solución conservante, por ejemplo con una solución que contiene un agente de conservación, una solución acuosa con pH ajustado y/o una solución acuosa salina.

12. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el líquido de la orina del recipiente de depósito se bombea primero a través de uno o varios filtros previos, preferentemente al menos a través de un filtro de profundidad o un filtro de masa filtrante sobre tamices, antes de que el líquido de la orina se bombee a través del cartucho.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado** porque el filtro previo es un filtro de profundidad con lecho de arena o un cartucho filtrante, un filtro de placas, un filtro de bujía, un filtro de saco o un tubo de filtración.

ES 2 266 221 T3

14. Procedimiento según la reivindicación 12 ó 13, **caracterizado** porque al líquido de la orina se le añaden antes de la filtración agentes coadyuvantes de filtración.

15. Dispositivo para la concentración y estabilización descentralizada, acorde con la práctica, de mezclas de estrógenos conjugados (CE) de la orina de yeguas preñadas (PMU) sobre un soporte sólido (adsorbente), el cual comprende

- un cartucho dispuesto en forma vertical, repleto con un agente de adsorción rodeado (continuamente) de líquido, adecuado para la adsorción de una cantidad predefinida de la mezcla de estrógenos conjugados (CE) contenida en el líquido de la orina de yeguas preñadas, comprendiendo el cartucho o bien a) una admisión de líquido dispuesta en el lado del fondo y una salida del líquido dispuesta en el lado de la cabeza, o b) una admisión de líquido dispuesta en el lado de la cabeza y una salida de líquido dispuesta en el lado del fondo,

- así como dispuestos corriente arriba del cartucho, en la secuencia indicada y conectados entre sí a través de mangueras,

- una bomba, un contador volumétrico y un medidor de cantidades de paso.

16. Dispositivo según la reivindicación 15, **caracterizado** porque entre la bomba y el contador volumétrico se intercala adicionalmente al menos un filtro previo, preferentemente un filtro de profundidad o un filtro de masa filtrante sobre tamices.

17. Dispositivo según la reivindicación 16, **caracterizado** porque el filtro previo es un módulo de dos filtros previos conectados en paralelo que pueden funcionar individualmente en forma alternativa y que también, en el caso de funcionamiento continuo del dispositivo, se pueden recambiar.

18. Dispositivo según la reivindicación 16 ó 17, **caracterizado** porque para controlar la función correcta del filtro previo se intercala un manómetro entre la bomba y el filtro previo, así como un manómetro en la zona corriente abajo del filtro previo, preferentemente corriente abajo del contador volumétrico.

19. Dispositivo según la reivindicación 15, **caracterizado** porque el cartucho tiene dimensiones internas para el lecho de agente de adsorción con una altura interior en el intervalo de aproximadamente 80 a 120 cm y un diámetro interior en el intervalo de aproximadamente 10 a 25 cm.

20. Dispositivo según la reivindicación 15, **caracterizado** porque el cartucho comprendido en el dispositivo es de vidrio de laboratorio resistente a los golpes, material sintético y/o metal.

21. Dispositivo según la reivindicación 15, **caracterizado** porque la bomba comprendida en el dispositivo es una monobomba, una bomba de manguera o una bomba de membrana.

22. Dispositivo según la reivindicación 15, **caracterizado** porque el contador volumétrico comprendido en el dispositivo es un rotámetro con flotador, un contador volumétrico de aspas rotatorias o un contador volumétrico inductivo.

23. Dispositivo según la reivindicación 15, **caracterizado** porque el medidor de cantidades de paso comprendido en el dispositivo para medir la cantidad de líquido de orina bombeada a través del cartucho es un contador de agua o un contador volumétrico.

Fig. 1

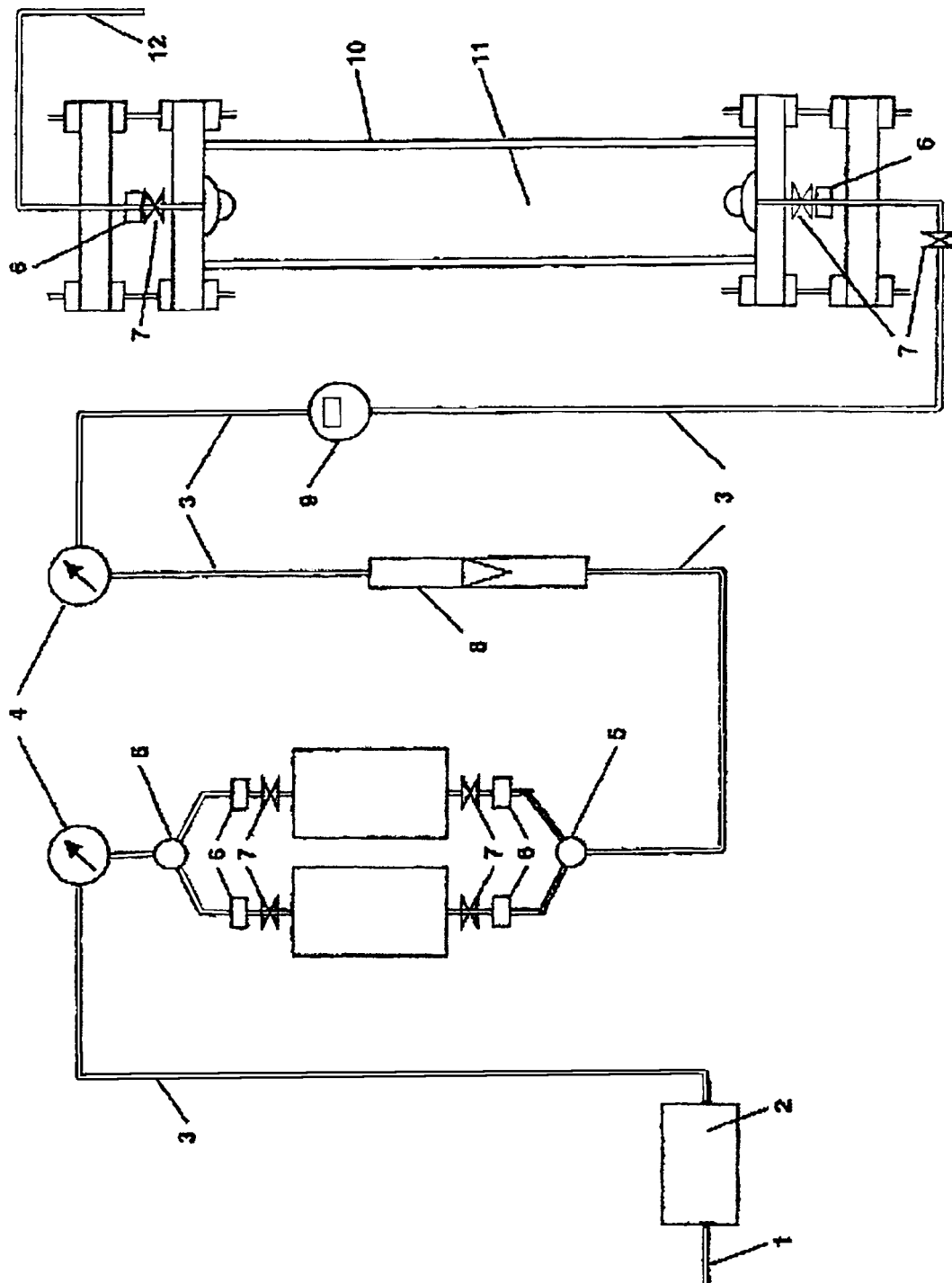


Fig. 2

