

公告本**發明專利說明書**

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 93/20985

※ 申請日期： 93.7.14

※IPC 分類：C07K14575 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

結合型牝馬雌激素天然混合物的獲取方法

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

索維伊製藥股份有限公司/ SOLVAY PHARMACEUTICALS GMBH

代表人：(中文/英文)

高斯曼 馬汀/GOSMANN, MARTIN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

德國漢諾威·漢斯-波克樂路 20 號

Hans-Böckler-Allee 20, 30173 Hannover, Germany

國 籍：(中文/英文) 德國/Germany

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 瑞斯區 海尼-海爾摩/ RASCHE, HEINZ-HELMER

2. 威爾伯德 凱斯坦/ WILBRAND, KIRSTEN

3. 班許貝曲 莎賓/ BANSCHBACH, SABINE

國 籍：(中文/英文)

德國/Germany

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. EPC；2003, 07, 17；03102215.5

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明涉及結合型牝馬雌激素的天然混合物的獲取方法，該混合物中酚類尿容物和非結合型親脂化合物被貧
 5 化，所述非結合型親脂化合物包括非結合型類黃酮、非結
 合型異類黃酮、非結合型去甲類異戊二烯、非結合型甾族
 (類固醇)化合物，尤其是雄烷-和孕烷-甾族化合物，以及類
 似的非結合型化合物。

【先前技術】

10 雌激素在醫學中用於激素替代療法。尤其是將雌激素
 混合物用於治療和預防婦女在自然停經或人為停經後出現
 的更年期症狀。已經證明，結合型雌激素的天然混合物，
 例如存在於妊娠牝馬尿液中的，以下被稱為結合型牝馬雌
 激素的天然混合物，對此特別有效且具有良好的耐受性。

15 溶解在妊娠牝馬尿液(=pregnant mares urine，以下簡稱
 為"PMU")中的固體的含量自然會在較大的範圍內變動，一
 般為每升40-90克乾物質。PMU的固體含量中，除尿素和其
 他常見的尿容物之外，酚類成份含量約為乾物質的2-5重量
 %。這些酚類成份中有甲酚和以HPMF著稱的二氫-3，4-雙
 20 [(3-羥基苯基)甲基]-2(3H)-呋喃酮。它們以游離或結合的形
 式存在。PMU中含有雌激素的天然混合物，很大程度上為
 結合的形式例如以硫酸半酯-鈉鹽(以下簡稱為"硫酸鹽")存
 在。結合型雌激素的含量(以雌激素硫酸鹽計算)為乾物質的
 0.1-0.5重量%。此外在PMU的固體含量中還可以存在其他

- 親脂化合物，其含量可以在較大的範圍內變化並且不可預見。這些親脂化合物主要來源於作為飼料被妊娠牝馬攝入的植物，主要包括各種類黃酮-、異類黃酮-、去甲類異戊二烯-衍生物和類似物質，例如7-羥基-4'-甲氧異黃酮、染料木黃酮、黃豆苷原、雞豆黃素A、馬醇和香豆雌醇。這些原本植物來源的親脂化合物可以在尿液中以結合或游離(非結合型)的形式存在。屬於在PMU的固體含量中出現的親脂成份，此外還有非結合型甾族化合物衍生物，在此尤其是雄烷-和孕烷甾族化合物，也稱非結合型雌激素衍生物。
- 10 含有結合型雌激素天然混合物的提取液，通常是採用固相提取法獲得的，或者通過基於使用與水不相混合或僅僅少量混合的有機溶劑的各種液-液-萃取步驟的方法而獲得。通常適宜的是，為使所獲取的結合型雌激素天然混合物能夠作為活性成份用於製藥，必須使之滿足特定的製藥
- 15 學規格，例如必須符合USP(美國藥典)或歐洲藥典制定的規格。如此，必須使結合型雌激素的含量相對於乾物質保持在特定的臨界值內。

- 美國專利No. 2, 551, 205和No. 2, 429, 398描述了一種用於由PMU製備一種水溶性雌激素製劑的方法，其中首先經過在活性炭或其他適宜的吸附性材料上的吸附，用一種可與水相混合的有機溶劑例如吡啶進行洗脫，隨即去除溶劑而獲取一種水性濃縮物，其含有原始使用的PMU中的水溶性雌激素成份的絕大部分。在美國專利No. 2, 429, 398中，將濃縮物用苯和/或乙醚萃取進一步提純，而在美國專
- 20

利No. 2, 551, 205中描述的是，將濃縮物酸化至pH-值為2-6，較佳為4-5，然後迅速用選自脂族、芳香族或脂環族的烴(例如己烷、苯、甲苯、環己烷)或氯代烴(例如氯仿、二氯化乙烯、三氯代乙烯、四氯代烴、氯苯)的與水幾乎不相混合的有機溶劑進行萃取，以使無用的物質如脂肪、油、游離型酚類成份和非結合型甾族化合物通過轉移至有機相而被去除。最後通過中和作用使水相穩定。美國專利No. 2, 551, 205推薦，將獲取的萃取液通過隨後的萃取步驟和沈澱作用進一步提純。總之，在實施美國專利No. 2, 551, 205描述的方法後，所獲取的產率僅僅約為所應用的濃縮物的雌激素成份的80%。

美國專利No. 2, 565, 115中描述了用丙酮由PMU提取結合型雌激素的方法。但是沒有陳述所獲取的雌激素級份的純度。

美國專利No. 2, 696, 265所描述的方法是，首先將雌激素用脂族醇或酮，例如己醇、環己醇或環己酮進行萃取。雌激素進入有機相，隨即被進一步提純，此外還將含有雌激素的水相用鹽酸調節至pH-值為4，並用二氯化乙烯萃取。

美國專利No. 2, 834, 712公開了高純度低毒性雌激素混合物的製備方法，其原理是採用多個獨立的具有不同溶劑和不同pH-值設置的萃取步驟。其中需要應用大量溶劑如己烷和苯。例如在某一步驟中將已經提純的濃縮物溶於水，用鹽酸調節至pH-值約為5.0，用苯並隨後用乙醚萃取，

以去除酚類成份。

國際專利申請書WO 01/27134描述了一種由PMU萃取結合型雌激素的相對簡單的方法：在添加鹽例如氯化鈉後，將PMU用至少同等容量的有機溶劑例如乙酸乙酯進行萃取，就此結合型雌激素進入有機相。將有機相分離並乾燥，以獲取提取液。WO 01/27134沒有陳述所獲取的結合型雌激素提取液的純度。

然而以上所描述的和由現有技術已知的液-液-萃取方法過程中會出現許多問題，如產生大量泡沫、產生沈澱、形成乳濁液和差的相分離。一般需要諸多萃取步驟，而導致損耗並只能部分獲取雌激素含量。而且這些萃取步驟還需要大量的部分有損健康的溶劑。此外在以上列舉的專利文本中，既沒有陳述在所獲取的產物中非結合型親脂成份(例如非結合型類黃酮-、異類黃酮-、去甲類異戊二烯-衍生物和類似的非結合型化合物)的含量或者是非結合型甾族化合物(尤其是雄烷-和孕烷-甾族化合物)的含量，也沒有陳述這些成份的去除過程。所述由現有技術已知的方法，不是在產率方面或者在所獲取的提取液的純度方面(相對於乾物質測量所獲取的激素的總量)均不能提供滿意的結果，就是需要諸多不同方法步驟和應用大量有機的和甚至部分根據毒理學觀點是不適宜的溶劑。

此外，由現有技術已知各種不同的固相提取方法，可用於獲取酚類尿容物被高度貧化的結合型牝馬雌激素的天然混合物。

國際專利申請書 WO 98/08526 如此描述了一種方法，其通過在一種半極性，尤其是在非離子型半極性的聚合物吸附樹脂上進行的固相提取，可以獲取酚類尿容物被貧化的、高度脫除甲酚和 HPMF 的、幾乎完全含有 PMU 中的天然
5 雌激素成份的混合物。國際專利申請書 WO 98/08526 描述了一種類似的方法，在固相提取時採用矽膠作為吸附材料。還有中國專利申請書 CN 1308083 描述了一種應用含氰基的極性吸附性樹脂的類似方法。另外 US 專利申請 US 2002/0156303 描述了一種方法，其中 PMU 在通過聚苯乙稀
10 吸附樹脂提純之前，首先用一種鹼性溶液處理並經過濾預先純化。如此所獲取的提取液適合於作為起始材料，用於製備所含活性成份來源於 PMU 的結合型雌激素天然混合物的藥物。

根據 WO 98/08526 或 WO 98/08525 的方法由 PMU 獲取
15 的結合型雌激素混合物通常可以達到所規定的製藥學規格的要求，例如在相對於乾物質的結合型雌激素含量方面所應遵守的臨界值。特別是借助於其中所公開的方法獲取酚類尿容物被貧化的、高度脫除甲酚和 HPMF 的產物。但是事實表明，在所獲取的乾物質中，除含有所需要的結合
20 型雌激素外，還可能含有非結合型親脂化合物。這些非結合型親脂化合物例如有各種非結合型類黃酮-、異類黃酮-、去甲類異戊二烯-衍生物及類似的非結合型化合物，例如 7-羥基-4'-甲氧異黃酮、染料木黃酮、黃豆苷原、雞豆黃素 A、馬醇和香豆雌醇，並且還包括非結合型甾族化合物，尤

其是雄烷-和孕烷-甾族化合物，以及非結合型雌激素，在此所列舉的並非囊括了全部可能性。由PMU所獲取的結合型雌激素混合物中這些非結合型親脂化合物的存在無法標準化，而游離型和結合型親脂化合物的含量和成份例如根據
5 妊娠牝馬所攝食飼料的不同而變化。

雖然結合型牝馬雌激素天然混合物的組成不會因為額外存在非結合型親脂化合物而有所改變，但是結合型牝馬雌激素相對於乾物質的含量卻會因此而降低。通過針對性地去除非結合型親脂成份，可以在所獲取的提取液中達到
10 較高的活性物質(即結合型牝馬雌激素)的濃度。此外，非結合型親脂化合物的分離保障了各個提取液批次的均一組成，因為如此非結合型親脂成份被去除了，所述非結合型親脂成份在PMU中的含量和組成與牝馬攝食種類的季節變化而相關地變化，並且由此獲得的提取液相對於乾物質都具有
15 近似的結合型牝馬雌激素含量。此外，非結合型親脂化合物的分離還有利於達到均一的生理學活性譜。例如從結合型牝馬雌激素的天然混合物中去除可能存在的非結合型親脂化合物可以是有意義的，因為它們或許本身具有內在的生理作用。

20 為了去除不需要的非結合型親脂化合物的一種可能是將例如借助已知的上述固相提取法獲取的結合型牝馬雌激素的天然混合物分開地用適宜的有機溶劑進行液-液-萃取，其針對性地將不需要的非結合型親脂化合物萃取而不會導致結合型牝馬雌激素的損失。這樣的一種方法在正在

進行中的國際專利申請PCT/EP 03/50703中有一般性的描述。

【發明內容】

本發明的目的在於，開發一種技術和經濟上優化的方法
5 法用於獲取結合型牝馬雌激素的天然混合物，其中所述混合物無論在酚類尿容物還是在非結合型親脂性化合物方面均是被高度貧化的。所述非結合型親脂性化合物特別是指非結合型類黃酮、非結合型異類黃酮、非結合型去甲類異戊二烯的衍生物。特別是本發明的一項任務在於開發一種
10 方法，其相對於已知的用於獲取結合型牝馬雌激素的天然混合物的方法無需額外的操作步驟。本發明的任務在於開發一種在固相提取過程中實現無論是酚類尿容物還是非結合型親脂化合物的貧化。進一步開發一種只需要少數方法步驟即能夠提供結合型牝馬雌激素的提取液的方法，並且
15 該提取液相對於乾物質具有較高含量的結合型雌激素。進一步應該使本發明的方法以簡便的方式還能夠從任娠牝馬的尿液中獲取一種結合型雌激素的天然混合物，即便所述尿液含有的非結合型親脂化合物量是變換著的且可能是升高了的。本發明的任務在於開發一種優化的用於固相提取
20 的方法，以使得所獲取的結合型牝馬雌激素的天然混合物具有優良的活性物質含量並滿足所要求的藥物規格，特別是鑒於相對於乾物質的結合型雌激素的含量應該遵守所要求的臨界值。

目前發現一種方法，其以令人驚奇的簡便方式可以從

PMU中獲取酚類尿容物被貧化的、高度脫除甲酚和HPMF的結合型牝馬雌激素混合物，所述獲取的結合型牝馬雌激素混合物同時在非結合型親脂性化合物(特別是指非結合型類黃酮、非結合型異類黃酮、非結合型去甲類異戊二烯的衍生物)方面也是被高度貧化的，即便所述PMU含有的非結合型親脂化合物量是變換著的且可能是升高了的。

根據本發明的方法建立於在WO 98/08526中所描述的用於從PMU中獲取酚類尿容物貧化的結合型雌激素的天然混合物的方法中的基本步驟。另外根據本發明的方法還建立於在國際專利申請WO 03/048183中所描述的方法，該方法也可以使用可能含有升高了的游離型雌激素份額的陳化PMU而獲取達到所要求的藥物規格的結合型雌激素的天然混合物。

【實施方式】

據此本發明涉及一種用於從妊娠牝馬的尿液中獲取結合型雌激素的天然混合物的方法，該方法包括

a) 將一尿液，其任選地為脫除了粘液物質和固體物質的尿液、經濃縮的所述尿液的濃縮物或所述尿液經膜過濾而獲得的經濃縮的尿滯留物，與一種用於吸附尿液中含有的結合型雌激素的混合物的足夠量的聚合物吸附樹脂接觸，並將被結合型雌激素的混合物載入的聚合物吸附樹脂從剩餘的尿液中分離，並且

b) 被結合型雌激素的混合物載入的聚合物吸附樹脂用一種pH-值調節到至少為12.0，特別是12.5~14.0的洗滌用

水洗滌，並且

c) 任選地進行中間洗滌步驟，其中用水洗滌被結合型雌激素的混合物載入的聚合物吸附樹脂，並且

d) 將經洗滌的吸附樹脂與一種用於解離所吸附的結合型雌激素的混合物的足夠量的洗脫液接觸，並且

e) 從吸附樹脂上分離含有結合型雌激素的天然混合物的洗出液並視需要地濃縮，

其中根據本發明的方法相對於現有技術的方法，其特徵在於，

10 所獲取的結合型牝馬雌激素的天然混合物在酚類尿容物和包括非結合型類黃酮、非結合型異類黃酮、非結合型去甲類異戊二烯、非結合型甾族化合物(尤其是雄烷-和孕烷-甾族化合物)的非結合型親脂化合物以及類似的非結合型化合物方面被貧化，且

15 在方法步驟(d)中作為洗脫液使用一種單相或二相混合物，其含有

(i) 水，任選地其pH-值被調節至鹼性範圍內，

且

(ii) 至少一種適用於洗脫選自上述列舉的非結合型親脂化合物的、與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑，

20 且任選地

(iii) 至少一種與水可混溶的有機溶劑，其選自與水可混溶的醚類、低級醇類和低級脂族酮類，以及前述溶劑的混合物，

並且

如果在方法步驟e)所獲取的、任選地經濃縮的洗出液為一種兩相混合物，將所獲取的由兩相構成的洗出液中的水相分離，並且獲取含有結合型雌激素的天然混合物的水相
5 並將其任選地濃縮。

各批次的準備，即本身已知的方法步驟a)，b)，d)和e)以及在方法步驟e)中獲取的含有結合型雌激素天然混合物的提取液的應用，已經在國際專利申請WO 98/08526中作為方法步驟a)，b)和c)有一般性描述，並且源於這些公開的專利申請由此對於本領域技術人員而言是熟悉的。本發明的
10 本身已知的方法步驟c)在國際專利申請WO 03/048183中作為”中間洗滌”有一般性描述，並且源於這些公開的專利申請由此對於本領域技術人員而言是熟悉的。所述WO 98/08526以及WO 03/048183的內容用於本發明的公開也作為本申請的內容。對於一般性方法的進一步的細節和可使用的材料在本發明的例示中做有總結。

例如可以根據WO 98/08526使用半極性，特別是非離子型半極性吸附樹脂。此外，依照本發明的方法令人驚奇地還可能與本發明的方法一起使用其他吸附樹脂而不會影響
20 產品質量或應遵守的藥物規格。如此在本發明的範圍內聚合物吸附樹脂適用於作為本發明的方法的吸附材料。在本發明的範圍內可使用的聚合物吸附樹脂在說明書的實施例部分將進一步地闡述。

根據本發明將利用所述方法獲取結合型牝馬雌激素的

天然混合物，其無論是在酚類尿容物如甲酚和HPMF還是在
 包括非結合型類黃酮、非結合型異類黃酮、非結合型去甲
 類異戊二烯、非結合型甾族化合物(尤其是雄烷-和孕烷-甾
 族化合物)的非結合型親脂化合物以及類似的非結合型化
 5 合物方面均是被高度貧化的。

在進行本身已知的方法步驟(a)至(c)之後，為此在方法
 步驟(d)中將經洗滌的載入有結合型雌激素的混合物的吸附
 樹脂用足夠量的用於洗脫結合型雌激素的混合物的洗脫液
 處理。根據本發明為此在方法步驟(d)中作為洗脫液使用的
 10 一種單相或兩相一混合物，其含有

(i) 水，任選地其pH-值被調節至鹼性範圍內，

且

(ii) 至少一種適用於洗脫非結合型親脂化合物的、與水
 不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑，所述非結合型親脂化
 15 合物包括非結合型類黃酮、非結合型異類黃酮、非結合型
 去甲類異戊二烯、非結合型甾族化合物，尤其是雄烷-和孕
 烷-甾族化合物，以及類似的非結合型化合物，

且任選地

(iii) 至少一種與水可混溶的有機溶劑，其選自與水可
 20 混溶的醚類、低級醇類和低級脂族酮類，以及前述溶劑的
 混合物，

在本發明的一個較佳實施方案中，在方法步驟(d)中作
 為洗脫液使用的一種單相或兩相一混合物，其含有

(i) 水，任選地其pH-值被調節至鹼性範圍內，

且

(ii) 至少一種適用於洗脫非結合型親脂化合物的、與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑，所述非結合型親脂化合物包括非結合型類黃酮、非結合型異類黃酮、非結合型去甲類異戊二烯、非結合型甾族化合物，尤其是雄烷-和孕烷-甾族化合物，以及類似的非結合型化合物，

且

(iii) 至少一種與水可混溶的有機溶劑，其選自與水可混溶的醚類、低級醇類和低級脂族酮類，以及前述溶劑的混合物，

在方法步驟(d)作為洗脫液應用的單相或兩相一混合物含有水(i)，任選地其pH-值被調節至鹼性範圍內。

如果在方法步驟(d)的情形下應用的洗脫液為單相-混合物，這種含水的洗脫液的pH-值在中性範圍直至鹼性範圍達pH 13，在pH 7和10之間可以是有利的。在含水的洗脫液中作為溶劑成份選自在所使用的pH-範圍下穩定的有機溶劑。含水的、單相洗脫液的所希望的pH-值是通過添加相應量的水溶性鹼性物質而調節的，較佳無機鹼，例如鹼金屬氫氧化物或鹼土金屬氫氧化物，特別是氫氧化鈉。

如果在方法步驟(d)的情形下應用的洗脫液為兩相一混合物，這種洗脫液的水相的pH-值在兩相的充分混合後在中性範圍直至鹼性範圍達pH 13，在pH 7和10之間可以是有利的。如果這種兩相洗脫液的水相含有一種有機溶劑成份，作為有機溶劑成份則選自在所使用的pH-範圍內穩定的有

機溶劑。兩相洗脫液的水相所希望的pH-值是通過添加相應量的水溶性惰性鹼性物質而調節的，較佳無機鹼，例如鹼金屬氫氧化物或鹼土金屬氫氧化物，特別是氫氧化鈉。

除了任選地調成鹼性的水(i)，在方法步驟(d)作為洗脫液應用的單相或兩相一混合物還含有至少一種有機溶劑(ii)用於洗脫非結合型親脂化合物，所述非結合型親脂化合物包括非結合型類黃酮、非結合型異類黃酮、非結合型去甲類異戊二烯、非結合型甾族化合物，尤其是雄烷-和孕烷-甾族化合物，以及類似的非結合型化合物。此外這種適宜的有機溶劑(ii)應該與水不混溶或幾乎不能混溶，在此幾乎不能混溶意指在水相中存在至多6體積%溶解的有機溶劑。在本發明的範圍內適用於洗脫非結合型親脂性化合物的有機溶劑(ii)，例如可以是下列具有1-10個碳原子、呈直鏈的、支鏈的或環狀排列的有機溶劑：C₄-C₁₀醇類(例如丁醇、己醇、環己醇和戊醇)、C₁-C₁₀酯化酸例如乙酸乙酯、乙酸甲酯、乙酸丙酯、乙酸異丙酯、乙酸丁酯、乙酸戊酯、乙基甲基丙二酸酯、二甲基磷酸酯、乙酸丁酯、乙酸戊酯)、C₃-C₁₀醛類和C₄-C₁₀酮類(例如丁酮、戊酮、己烷-2，4-二酮、己二醛、環己烷甲醛、丁烷-1，2，4-三甲醛、甲基苯基酮及類似化合物)、以及所有的C₃-C₁₀烷氧基-化合物、C₂-C₁₀醚類(乙醚、甲基叔丁基醚)、C₃-C₆腈類和C₁-C₃鹵代烷烴(二氯甲烷)，以及前述溶劑的混合物。尤其是在本發明的範圍內可以使用乙酸-C₁-C₄-烷酯、丁醇、環己醇、己醇、乙醚、二氯甲烷、甲基叔丁基醚和所述溶劑的混合物作為

適合用於洗脫非結合型親脂化合物的、與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)。在此可選範圍內，乙酸-C₁-C₄-烷酯，尤其是乙酸乙酯和／或乙酸異丙酯較佳為所使用的適合用於洗脫非結合型親脂化合物的、與水不混溶或幾乎不能混溶
5 的本發明的有機溶劑(ii)。

此外，根據本發明在方法步驟(d)作為洗脫液應用的單相或兩相一混合物還任選地含有至少一種與水可混溶的有機溶劑(iii)，其選自與水可混溶的醚類、低級醇類和低級脂族酮類，以及前述溶劑的混合物。作為洗脫液的醚成份適
10 宜的是與水可混溶的環狀醚如四氫呋喃或二噁烷，但也可以是與水可混溶的開鏈的醚類如乙二醇二甲醚(= Monoglyme)、二甘醇二甲醚(= Diglyme)或乙氧基乙氧基乙醇(= Carbitol)。作為低級醇類適宜的是與水可混溶的具有1
~4，較佳1~3個碳原子的烷基醇，特別是乙醇或異丙醇。
15 低級脂族酮類適宜的是與水可混溶的具有3~5個碳原子的酮類，特別是丙酮。此外，已表明特別有益的洗脫液是，其中與水可混溶的有機溶劑(iii)為丙酮、乙醇或丙酮和乙醇的混合物。

在本發明的一個較佳的實施方案中，除了任選地調成
20 鹼性的水(i)外，在方法步驟(d)中作為洗脫液應用的單相或兩相一混合物還含有作為適用於洗脫非結合型親脂化合物與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)的乙酸-C₁-C₄-烷基酯，較佳乙酸乙酯和／或乙酸-異丙酯，和作為與水可混溶的有機溶劑(iii)的丙酮和／或乙醇。

在本發明的另一個較佳的實施方案中，除了任選地調成鹼性的水(i) 外，在方法步驟(d)作為洗脫液應用的單相或兩相一混合物還含有作為適用於洗脫非結合型親脂化合物與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)的乙酸乙酯，和
5 作為與水可混溶的有機溶劑(iii)的丙酮。

在方法步驟(d)作為洗脫液應用的單相或兩相一混合物中水(i)和與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)的體積比例可以在5：1至1：5的範圍內，特別是2：1至1：2的體積比例範圍被認為是適宜的。

10 此外，在方法步驟(d)作為洗脫液應用的單相或兩相一混合物中水(i)和與水可混溶的有機溶劑(iii)的體積比例可以在4：1至1：5的範圍內，較佳2：1至1：3的體積比例範圍被認為是適宜的。

特別是，在方法步驟(d)作為洗脫液應用的單相或兩相
15 一混合物中水(i)同與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)的總體積和與水可混溶的有機溶劑(iii)的體積比例可以在5：1至1：5的範圍內，較佳在2：1至1：2的範圍內。

在本發明的一項特別較佳的實施方案中，在方法步驟(d)作為洗脫液應用的單相或兩相一混合物由(i)水，(ii)乙酸
20 -C₁-C₄-烷基酯，較佳乙酸乙酯和／或乙酸-異丙酯作為與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑和(iii)丙酮和／或乙醇作為與水可混溶的有機溶劑一起組成，並且體積比例在1：1：1至1：1：2的範圍內。特別是在方法步驟(d)作為洗脫液應用一種單相-混合物，其由(i)水，(ii)乙酸乙酯作為與水不

混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑，和(iii)丙酮作為與水可混溶的有機溶劑以體積比為1：1：1.4組成。

如果在方法步驟(d)作為洗脫液應用的是一種兩相一混合物，建議直接在載入於柱之前將兩相充分混合。

- 5 所使用的洗脫液的體積可以約為3至10，特別是約4至6柱體積每柱體積的聚合物吸附樹脂。適宜的是將洗脫液通過一個含有載入了雌激素混合物的吸附樹脂的反應器以這樣的洗脫速度進行，即接觸時間足以用於充分洗脫結合型雌激素的混合物。在以體積比例為10：10：14的水、乙酸
- 10 乙酯和丙酮的單相混合物的應用下洗脫速度例如為3至10，較佳5至7體積份額洗脫液每體積份額吸附樹脂每小時是適宜的。適宜的是，洗脫在溫度範圍約為20°C至80°C之間，較佳在約30°C和約50°C之間進行。理想的是，通過略微升高的壓力，例如在直到0.2巴的過壓下操作，調節洗脫速
- 15 度並且洗出液以多個級份收集。

- 各個洗出液級份的結合型雌激素、酚類尿容物如甲酚和HPMF、和非結合型親脂化合物的含量可以用本身已知的方式通過高效液相色譜(= high performance liquid chromatography，簡稱為"HPLC")或通過氣相色譜(簡稱為
- 20 "GC")確定。

洗脫過程中在方法步驟e)中首先獲得淺色至無色，幾乎無雌激素的前洗脫級份(Vorlaufraction)，其體積約相應於柱體積。結合型雌激素的主要體積，例如80~99%的存在於初始PMU中的結合型雌激素，在隨後的深黃褐色的主要洗脫

級份中，其體積一般為2至4倍柱體積。在後來的後洗脫級份中一般只含有痕量的結合型雌激素。如果所獲得的後洗脫級份還含有相對於乾物質超過10重量%的結合型雌激素和相對於乾物質低於0.6重量%的甲酚和HPMF，則可以將其與富含雌激素的主要洗出液合併用於進一步的加工。

在方法步驟(e)中所獲得的洗出液可以是單相或兩相混合物。即使是應用單相混合物作為洗脫液也可通過柱對在洗脫前就存在於吸附樹脂柱的水的排放和由此產生的水相和有機相體積比例的變化而致使洗出液由兩相組成。理想的是可以將在方法步驟(e)中所獲得的單相或兩相洗出液以本身已知的方式進一步濃縮。特別是，如果在方法步驟(e)中所獲得的洗出液是單相的，該洗出液被濃縮以便較佳去除與水可混溶的有機溶劑(iii)直至所述濃縮的洗出液成為兩相一混合物。

如果在方法步驟(e)中獲得的、視需要經濃縮的洗出液為兩相混合物，根據本發明在方法步驟(f)中將獲得的由兩相組成的洗出液中的水相分離，而獲得一種含有結合型雌激素的天然混合物的水相。為此靜置所獲得的兩相洗出液以便達到相的分離。所述相分離可以分別根據所獲得的體積需要10分鐘至24小時的時間，優選靜置所述相5至10小時。當水相和有機相彼此分開後，將水相分離並用於進一步的應用，有機相被放棄。

在分離有機相和水相之後，將在步驟(f)中獲取含有結合型雌激素天然混合物的水相。該水相含有在PMU中出現

的結合型雌激素天然混合物，只含有少量份額的來源於PMU中存在的酚類尿容物，如甲酚和HPMF，以及極少量份額的來源於PMU中存在的非結合型親脂成份。視需要可以將該水相按照本身已知的方式進一步濃縮，以獲取高度
5 去除有機溶劑的、適合於進一步處理過程的濃縮液。因此可以例如將仍存在的有機溶劑殘餘物從所獲取的水相中蒸餾除去。通過蒸餾還可以將水性萃取相的乾物質含量調節至具體的數值，較佳乾物質含量調節至5-15%之間的範圍內，尤其較佳乾物質含量為9%。隨即為了穩定所獲取的結
10 合型牝馬雌激素的天然混合物，還可以將水性萃取液的pH-值調節至鹼性範圍內，較佳在8-13之間的範圍內，更較佳在9-12之間的數值範圍內。用通常適合於調節pH-值的鹼調節pH-值，例如1N NaOH或Na₂CO₃。

根據本發明在方法步驟(f)所獲取的、任選地還需進一步處理或濃縮的水相可以作為起始材料，用於製備含結合
15 型牝馬雌激素天然混合物的藥物。視需要可以通過合適的乾燥工序，例如噴霧乾燥法或流化床乾燥法製備不含洗脫劑的固體混合物。如果結合型雌激素天然混合物用於製備固態藥物，適宜的是，於濃縮和乾燥之前，就已經在含有
20 結合型雌激素的水相中混合加入固態載體物質，以這種方式獲取含有結合型雌激素和載體物質的固體混合物。例如可以將含有結合型雌激素的水相在流化床中噴塗於一種固態載體物質上，例如纖維素。無論是含有雌激素混合物的水相，還是由此製備的濃縮液或經乾燥的固體產物，均可

以按照本身已知的方式加工成固態的或液態的蓋倫式製劑，如片劑、糖衣劑型、膠囊或乳劑。可以按照本身已知的方式，在應用常規的固態或液態載體物質如澱粉、纖維素、乳糖或滑石粉或液體石蠟和/或在應用常規的製藥學佐劑，例如片劑崩解劑、增溶劑或貯藏劑的條件下，製備這些蓋倫式製劑。如此可以將含有結合型雌激素的產物與製藥學載體物質和佐劑按照本身已知的方式混合，然後將該混合物轉化成適宜的劑型。

根據本發明所描述的固相-提取法，從尿液中獲取結合型牝馬雌激素的天然混合物，所述尿液任選地為脫除了粘液物質和固體物質的尿液、經濃縮的所述尿液的濃縮物或所述尿液的經膜過濾而獲得的經濃縮的尿滯留物，其中所述混合物以簡單的方法高度貧化所述混合物中無論是酚類尿容物(如特別是甲酚和HPMF)還是多種非結合型親脂性化合物。去除的非結合型親脂化合物尤其是指非結合型類黃酮、非結合型異類黃酮、非結合型去甲類異戊二烯和非結合型甾族化合物，在此尤其是指非結合型雄烷-和非結合型孕烷-衍生物。

與已知的固相-提取法相比較，根據本發明的固相-提取法提供一種無論是酚類尿容物還是非結合型親脂性化合物均被高度貧化的結合型牝馬雌激素的天然混合物，其中根據本發明不存在額外的操作步驟，因為即使是非結合型親脂化合物的貧化也已經在所述固相提取法中完成了。

在從WO 98/08526已知的方法中非結合型親脂化合物

的一部分，例如異黃酮馬醇，在方法步驟b)洗出，而其他非結合型親脂化合物，例如7-羥基-4'-甲氧異黃酮，隨同進入洗出液並視需要必須通過隨後的液-液-萃取分離。對於非結合型，即游離型甾族激素也是相類似的情況，其同樣在洗出液中以一定的份額檢測得到。因此極為令人驚奇的是，對於定量地洗脫，在聚合物吸附樹脂上吸附的結合型雌激素可以使用由水、一種與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑以及視需要一種與水可混溶的有機溶劑如低級醚類、醇類或酮構成的單相或甚至於兩相混合物，並使所獲得的、視需要經濃縮的洗出液分為兩相，其中經定量洗脫的結合型雌激素幾乎只在水相中被再度發現，而不需要的、非結合型親脂化合物在有機相中並可以簡便地去除。

本發明的方法進一步提供一種結合型牝馬雌激素的提取液，其相對於乾物質具有比較高含量的結合型雌激素。如此採用本發明的方法，即便當尿液含有變換的和可能提高的非結合型親脂化合物，也能以簡便的方式從妊娠牝馬的尿液中獲取結合型雌激素的天然混合物，而不需要在所述固相提取法之後進行進一步的提純步驟。

通過本發明的方法作為活性物質—提取液所獲得的、非結合型親脂成份和酚類尿容物被貧化的結合型牝馬雌激素的天然混合物，相對於通過已知的固相提取法所獲取的活性物質—提取液，表現出顯著理想的藥物規格，正如根據本發明所確立的。

必須稱為極其令人驚奇的是，已知的固相提取法在根

據本發明的變化下，即便是提供結合型雌激素的天然混合物的妊娠牝馬尿液中含有不同和變換含量的非結合型親脂成份，也可以導致所獲取的活性物質提取液如此的質量改善。特別令人驚奇的是，與所使用的PMU相關而無論是在含量還是在組成上可能大幅度變換的非結合型親脂化合物的份額，通過本發明的方法可以如此確保地減少，在方法步驟f)中作為水相可以獲得符合藥物規格的高要求的天然結合型牝馬雌激素的混合物，所述藥物規格的要求例如是根據USP或歐洲藥店所提出的要求。

正如以上詳細描述的，根據本發明的方法相對於現有技術具有一系列優點和改善。所以本發明還能夠使用非結合型親脂成份含量變換的PMU，例如其可以具有較高含量的游離型類黃酮、游離型異類黃酮、游離型去甲類異戊二烯或游離型甾族化合物衍生物，在此尤其是游離型雄烷-或游離型孕烷-甾族化合物，而不致影響應該遵守的製藥學規格。其中根據本發明的方法建立於已知固相提取法之上，卻令人吃驚地不再需要其他提取步驟。由此根據本發明的方法可以保障各個提取液批次的均一組成，因為總是能夠去除在PMU中的含量和組成取決於妊娠牝馬所攝食的飼料種類而會有所變化的非結合型親脂成份，並且由此使所獲取的提取液相對於乾物質都具有近似的結合型牝馬雌激素含量。此外通過使用根據本發明的方法以一次性操作步驟不僅針對性地去除酚類尿容物還特別針對性地去除非結合型親脂成份，而使在所獲取的提取液中具有較高濃度的活

性物質，即結合型牝馬雌激素。根據本發明方法還具有經濟優點，因為明顯減少了在不能遵守製藥學規格的情形下放棄貴重活性物質的風險，例如結合型雌激素含量相對於乾物質不夠的情況。此外通過應用根據本發明的所述方法
5 能夠基本準確而且重複地調節所獲取的提取液中活性物質的含量。該活性物質成份突出地適合於製備含有天然牝馬雌激素混合物作為活性物質的藥物。

以下實施例應能進一步描述本發明，而並非將其範圍僅限於此。

10 實施例

以下實施例將描述由PMU獲取活性物質提取液的一般工作規則，所述提取液含有PMU中所含有的結合型雌激素天然混合物，並且其中不僅酚類尿容物(例如甲酚或HPMF)而且非結合型親脂化合物(例如非結合型類黃酮、非結合型
15 異類黃酮、非結合型去甲類異戊二烯、非結合型甾族化合物、尤其是雄烷-和孕烷-甾族化合物和類似的非結合型化合物)均被高度貧化。其顯示根據本發明如何由非結合型親脂化合物份額變換或提高的PMU獲取活性物質含量高的優質提取液。

20 尿液：

對於本發明的方法可以作為尿液的正如根據WO 98/08526所述為如下的PMU，即使用一種通過濃縮從PMU中獲取的濃縮物或一種通過過濾或類似的方法已經預先純淨過的從PMU中獲取的濃縮物。所收集的尿液(PMU)首先

- 以本身已知的方式脫除粘液物質和固體物質。適宜的是使固體物質和粘液物質沈積，然後依照本身已知的分離方法，例如滲析，分隔和／或過濾而分離。所以PMU可以例如通過一種本身已知的分離裝置，例如分離器、過濾裝置或
- 5 沈澱器導出。作為分離裝置可以例如使用一種沙床，或可以使用商購可得的分離器，例如噴嘴分離器(Düsenseparatoren)或腔室分離器(Kammerseparatoren)。需要時還可以使用微過濾儀器或超過濾儀器，在其應用中同時可以致使經過濾的PMU高度脫除黴菌和病毒。
- 10 任選地可以在尿液或尿濃縮物中加入防腐劑、殺微生物劑、殺菌劑和／或抗蠕蟲劑。

- 作為預先純淨過的尿濃縮物還可以使用通過本身已知的膜過濾方法從PMU中獲得的濃縮的PMU滯留物。滯留物中的固體含量及其組成可以分別根據所使用的PMU和用於
- 15 膜過濾所使用的膜如孔徑，以及過濾條件而變化。例如可以在使用納米過濾膜的情形下幾乎達到在PMU滯留物中雌激素含量的濃度無損失，且同時去除達50重量%的低分子量的PMU內容物。對於本發明的方法可以使用濃縮比例達到約1：10，例如比例約為1：7的PMU滯留物，由此其體積
- 20 可以濃縮至原PMU體積的約1/10，例如約1/7。

吸附樹脂：

在方法步驟a)中可使用的聚合物吸附樹脂根據WO 98/08526是半極性的，特別是非離子型半極性的聚合物吸附樹脂。在根據本發明的方法作為吸附材料可使用的聚合

物吸附樹脂較佳多孔的有機非離子聚合物，其與非極性疏水性聚合物吸附樹脂相反具有中等的極性(=例如樹脂的活性表面的偶極矩在1.0至3.0，特別是在1.5至2.0德拜的範圍內)並具有略微親水性的結構，例如聚碳酸酯樹脂。適宜的是使用大孔半極性樹脂，所述大孔半極性樹脂較佳具有巨網結構，平均孔徑在50至150埃，較佳在70至100埃的範圍內，並且具有比表面積在300至900 m²/g，較佳400至500 m²/g的範圍內。表明特別適宜的是巨孔交聯的脂族聚碳酸酯樹脂，特別是交聯的聚丙烯酸酯樹脂如Rohm和Haas公司的Amberlite XAD-7(HP型)，為非離子型半極性吸附樹脂。

除了所述較佳的吸附材料還可以使用其他吸附樹脂。在此適合作為吸附樹脂的不僅是非極性、半極性還有極性吸附樹脂。能夠泵入吸附材料的尿液量在此首先依據吸附樹脂各自的吸附能力而確定。可使用的吸附樹脂的實例是商購可得的類型，例如具有苯乙烯二乙烯基苯的基本結構單元(例如XAD-1180型，XAD-2型，XAD-16型)，具有丙烯酸酯基本結構單元的聚合物Amberlite聚合材料(例如XAD-7)或那些具有含高極性基本結構的氮和氧的聚合物Amberlite聚合材料(例如XAD-12)。其他吸附樹脂為Dowex-樹脂(苯乙烯和二乙烯基苯的共聚物)，例如Dowex 112、Dowex Optipore、Dowex Optipore V 493；Lewatite(交聯的聚苯乙烯)例如Lewatit OC 1064、Lewatit OC 1066 或Lewatit OC 1163，聚胺陰離子交換樹脂，例如Dowex-樹脂。有利的吸附樹脂特別是XAD-7(HP型)、XAD-16(HP型)、

XAD 118和Dowex Optipore，較佳的是Dowex Optipore V 493以及Lewatite OC 1064、OC 1066和OC 1163.

方法步驟a)：

結合型雌激素在聚合物吸附樹脂上的吸附可以依據W0 5 98/08526，也如在根據本發明的方法中通過使視需要經預加工的PMU或其滯留物與吸附樹脂進行接觸，方法是將尿液導入含有吸附樹脂的反應器並在其中保留與吸附樹脂接觸足夠用於吸附雌激素成份的時間。

在聚合物吸附樹脂上成功地吸附結合型雌激素後可以
10 將載入有結合型雌激素的天然混合物的吸附樹脂與剩餘的尿液以本身已知的方式分離。適宜的是可以將尿液通過含有吸附樹脂的柱以這樣的流通速度進行，即接觸時間足以用於吸附雌激素含量。適宜的是例如流通速度相當於3至10，較佳5至7體積份PMU每1體積份吸附樹脂每小時的通過量
15 。適宜的是尿液通過反應器的流通速度可以在略微的過壓或減壓下加工而控制。聚合物吸附樹脂的應用量可以分別根據所使用的吸附樹脂的類型和在尿液中的固體含量而變化。在使用PMU的情形下可以例如一體積份吸附樹脂，例如交聯的脂族聚碳酸酯-吸附樹脂，用達至80，較佳為30至
20 50的體積份的經預處理的PMU載入，而不會在流出的尿液中檢測到顯著量的雌激素。在使用PMU—濃縮物或PMU—滯留物的情形下，當然吸附樹脂的載入能力隨其濃縮的程度而減少。由此可以例如1體積份交聯的脂族聚碳酸酯-吸附樹脂用與20至80，較佳30至50體積份的PMU相應量的尿

液載入。

方法步驟b)：

被結合型雌激素的混合物載入的聚合物吸附樹脂將在方法步驟b)中用調節至pH-範圍至少為12.0，特別是12.5至14，較佳約12.5至13.5的洗滌水洗滌。作為洗滌水可以使用在尿液中溶解的惰性鹼性物質的水溶液，其足夠使pH-值達到至少12.5。作為對於聚合物吸附樹脂惰性的水溶性鹼性物質適宜的是，較佳水溶性無機鹼如鹼金屬氫氧化物或鹼土金屬氫氧化物，特別是氫氧化鈉。適宜的是所述洗滌水只約含有使之達到理想的pH-值(較佳約pH 13)所需要的鹼性物質的量。如此選擇洗滌水的量，使之足夠高度去除酚類尿容物而不會就此伴隨著洗掉值得一提的量的結合型雌激素。表明適宜的是例如使用2至10，特別是4至6柱體積的洗滌液每柱體積的吸附樹脂。在此將洗滌水適宜地以3至10，較佳5至7，體積份洗滌水每1體積份吸附樹脂每小時的流通速度通過含有吸附樹脂的反應器。

方法步驟c)－中間洗滌步驟：

在方法步驟b)之後的中間洗滌步驟中用水洗滌在方法步驟a)中加載入有結合型雌激素的混合物的聚合物吸附樹脂。洗滌水的量如此選擇，即在最後的方法步驟e)中所獲得的洗出液具有結合型雌激素的混合物，其滿足對於游離型雌激素高含量的要求並由此作為活性物質成份可以用於製藥。表明適宜的是每柱體積的吸附樹脂例如應用1至8，較佳1至4，柱體積的洗滌水。在此將洗滌水適宜地以3至10

，較佳5至7體積份洗滌水每1體積份吸附樹脂每小時的流通速度通過一種含有吸附樹脂的反應器。

在一個根據本發明的方法的有利的實施方案中，所述中間洗滌步驟在低於室溫下，特別是在0°C和10°C的溫度下進行，因為發現通過附加的中間洗滌步驟可能隨條件激素或活性物質的損失可以明顯減少。室溫是通常被認為的環境溫度，例如描述的是在20°和30°C之間的溫度。極其適宜的是所述方法在實際的0°C或近似0°C的溫度下進行。在實踐中，因此建議在高於接近0°C的溫度下操作並通過相應的措施用以維持所屬的溫度範圍。為此可以用常規的措施用於降低溫度，例如使用經冷卻的反應器、經冷卻的材料和／或經冷卻的原料如PMU。溫度為0°C或接近0°C從實際的角度出發可以理解為0°C約至5°C，特別是0°C約至3°C。

為了在中間洗滌步驟維持盡可能少的可能的激素損失，根據所述變體方案在中間洗滌步驟中和／或也在方法步驟b)中使用的調成鹼性的洗滌水預冷卻至低於室溫，特別是在0°C和10°C之間的溫度。進一步適宜的或較佳的溫度範圍是如前述列舉的從0°C約至5°C，特別是從0°C約至3°C的溫度。較佳在0°C或接近0°C的溫度下操作，即較佳在中間洗滌步驟中和／或也在方法步驟b)中所使用的調成鹼性的洗滌水預冷卻至高於接近0°C的溫度。通過經冷卻的調成鹼性的洗滌水在方法步驟b)中的應用預冷卻或維持吸附樹脂的已經完成的冷卻，例如為了避免在加入經冷卻的用於中間洗滌步驟的洗滌水時發生所不希望的再度升溫。因此較

佳中間洗滌步驟和所述前序的方法步驟b)兩者在同一溫度範圍內進行，例如在低於室溫，特別是在0 °C和10 °C之間或較佳在如上所給出的溫度範圍內的溫度。

在本發明的前述的低於室溫的溫度下進行的變體方案中，值得希望的是可以將所有使用的裝置如用於承載聚合物吸附樹脂的反應器或已經裝有聚合物吸附樹脂的反應器和／或所使用的PMU預冷卻至低於室溫，特別是在0°C和10°C之間的溫度或在上述列舉的較佳維持的溫度範圍之內進行使用。

10 本發明的方法步驟d)，e)和f)：

隨後根據本發明的方法步驟d)的描述，所述經洗滌的載入有結合型雌激素的混合物的吸附樹脂採用足夠用於洗脫結合型雌激素的混合物的量的洗脫液處理，在方法步驟e)中獲得一種含有PMU的結合型雌激素的天然混合物的洗出液，並視需要地濃縮。如果所獲得的、視需要經濃縮的洗出液為一種兩相混合物，則在方法步驟f)中分離洗出液的水相，以便獲取一種含有PMU的結合型雌激素的天然混合物的水相，其視需要可以進一步地濃縮。

吸附樹脂柱的再生

20 為了柱的再生首先分別使用1至4，特別是2至3柱體積的調節至pH 13 的含有50%乙醇的乙醇/水-混合物每柱體積吸附樹脂，然後用相應體積的10%檸檬酸鈉水溶液和最終用相應體積的蒸餾水洗滌。整個再生過程在40°C至45°C的溫度下進行。該柱可多次，例如多至40次載入和重複再

生。

實施例1：

相應於WO 98/08526和WO 03/048183的方法的對比實施例

5 實施例2a，2b和3(根據本發明的方法)

實施例2a：在室溫下用50體積％的乙酸乙酯洗脫

實施例2b：在45℃下用50體積％的乙酸乙酯洗脫

實施例3：在40℃下用單相的含乙酸乙酯的洗脫液混合物洗脫

a)在半極性聚丙烯酸酯-吸附樹脂上吸附PMU的雌激素
10 含量(用於所有實施例)

330毫米柱高的具有直徑為40毫米的柱用200毫升的在水中溶脹的半極性聚丙烯酸酯-吸附樹脂(= Rohm和Haas公司的Amberlite XAD-7(HP型)，粒度為0.3至1.2毫米，偶極矩為1.8德拜，平均孔徑為80埃，比表面積約450 m²/g，乾燥的)裝填。7升(=35柱體積，下文簡稱為BV)經超過濾裝置
15 過濾的PMU於室溫下在實施例1中採用流通速度為平均16.7毫升／分鐘(= 5 BV/h)，在實施例2a中採用40毫升／分鐘(= 12 BV/h)和在實施例2b和3中採用24.4毫升／分鐘(= 7.3 BV/h)通過柱，其中PMU的結合型雌激素含量，以雌激素
20 素硫酸鹽、馬烯雌酮硫酸鹽和17- α -二氫-馬烯雌酮的總和計算，以及甲酚借助HPLC確定(數值請參見表I)。PMU的雌激素含量將完全被吸附在如此被載入的半極性吸附樹脂柱上。所述流過的尿液借助HPLC檢測其合型雌激素含量並表明實際上無雌激素。丟棄所述流過的尿液。

b)經載入的吸附樹脂柱的洗滌(用於所有實施例)

採用1.0升(=5 BV)的pH-值為13的氫氧化鈉水溶液洗滌經載入的吸附樹脂柱。為此將鹼性洗滌水採用平均為16.7毫升／分鐘的流通速度(= 5 BV/h)通過柱。所流出的洗滌液體借助HPLC檢測其中結合型雌激素和甲酚的含量。該檢測顯示，在洗滌期間低於全部載入於柱上的雌激素的5%被洗出。

c)中間洗滌步驟(用於所有實施例)

採用600毫升水(= 3 BV)洗滌經載入的吸附樹脂柱。在此中性洗滌水以平均為16.7毫升／分鐘的流通速度(= 5 BV/h)通過柱。所流出的洗滌液體借助HPLC檢測其中結合型雌激素和甲酚的含量。該檢測顯示，在洗滌期間只有占全部載入於柱上的雌激素的極少部份(至多只有約若干百分數)被洗出。

d)和e)從經洗滌的吸附樹脂柱上解離結合型雌激素
實施例1—對比實施例

1.1升(= 5.5 BV)的洗脫液(乙醇/水30：70)採用平均為8.2毫升／分鐘(= 2.4 BV/h)的流速通過預熱至45°C的柱。將所流出的洗出液以6個級份E 1至E 5收集。所述級份各為200毫升(= 1柱體積)或100毫升(= 0.5柱體積對於E 6)並借助HPLC檢測其中的結合型雌激素和甲酚的含量(數值請參見表I)。

前四個級份含有占柱所吸附的結合型雌激素總量的約80至98%。後續的級份只含有少量的結合型雌激素。含有

結合型雌激素主要量的級份是適用於蓋倫氏進一步加工的提取液。

實施例2：

在室溫下用50體積％的乙酸乙酯洗脫(實施例2a)

5 在45°C下用50體積％的乙酸乙酯洗脫(實施例2b)

將900毫升(= 4.5柱體積)的兩相洗脫液(比例為50：50的乙酸乙酯-水混合物)採用16.7毫升／分鐘(= 5.0 BV/h)的平均流速通過處於上述的洗脫溫度的柱。所述流出的洗出液以9個級份E 1至E 9收集。所述級份分別為100毫升(= 0.5 BV)，從第四個級份開始獲得的洗出液是兩相一混合物，其為了用於分析各個提取液，分隔為水相和有機相(E 4至E 9，分別以LM表示溶劑和W表示水相)。所有級份將借助HPLC檢測其結合型雌激素和甲酚的含量(數值請參見表I)。對於某些級份還將借助GC確定非結合型親脂化合物含量，例如

10 7-羥基-4'-甲氧異黃酮(數值請參見表II)。

15

前三個級份只含有痕量的雌激素。隨後的級份4至8的水相含有占柱所吸附的結合型雌激素總量的約80至98％。後續的級份只含有極少量的雌激素。含有結合型雌激素主要量的級份是適用於蓋倫氏進一步加工的提取液。

20 為了控制根據本發明的採用乙酸乙酯-水-混合物洗脫的徹底性，隨即在提取後連接一個採用單相乙醇-水-混合物(30：70)進行的已知的萃取。

通過隨後的乙醇洗脫，在實施例2a中仍然洗脫出顯著量(相當於約6.8％的總載入量)的結合型雌激素。通過將洗

脫溫度提高至45°C可以使仍在柱上留存的只有通過乙醇才能洗脫的結合型雌激素的量降低至低於1%。

實施例3：

在40°C下採用單相含有乙酸乙酯的洗脫液混合物洗脫
 5 1.0升(= 5 BV)單相洗脫液(以體積比例為1:1:1.4的乙酸乙酯-水-丙酮混合物)採用16.7毫升/分鐘(= 5.0 BV/h)的平均流速通過處於溫度為40°C的柱。所述流出的洗出液以13不同量的級份收集。第一個級份為100毫升(= 0.5 BV)，隨後的10級份分別為50毫升(=0.25 BV)，而最後的兩個級份
 10 分別收集200毫升。從柱中排出洗滌水後令人驚奇地已經在洗出液中分為兩個相(從級份4開始)。所有級份均借助HPLC檢測其結合型雌激素和甲酚的含量(數值請參見表II)。

第一個級份只含有痕量的雌激素。在隨後的級份2至7含有占柱所吸附的結合型雌激素總量的約80至98%。最後
 15 的級份只含有極少量的雌激素。含有結合型雌激素主要量的級份是適用於蓋倫氏進一步加工的提取液。

所述洗出液E7至E13直至約24小時後才分為兩相。所述洗出液E1至E7合併如下加工：所述洗出液E1至E7用500毫升分液漏斗合併獲得約350毫升的溶液。沒有即可出現相分
 20 離，但在靜置一個週末後可見約10毫升的小量的有機相位於分液漏斗的上端。所述相借助HPLC檢測其結合型雌激素和甲酚的含量。在相分離後將水相在旋轉蒸餾器中於70°C濃縮至TS為8-10%(在此為8.16%TS，數值請參見表I)

吸附樹脂柱的再生(用於所有實施例)

為了再生首先採用400毫升調節至pH 13的含有50%乙醇的乙醇/水-混合物洗滌柱，然後採用400毫升10%的檸檬酸鈉的水溶液和最終採用400毫升蒸餾水洗滌。整個再生過程在40℃至45℃的溫度範圍內進行。柱可以多次，例如多至40-次載入和重複再生。

對於在洗脫中所獲得的含有主要量的結合型雌激素的級份在下表中分別表示出以重量%計的TS含量和通過HPLC確定的結合型雌激素以及甲酚的含量(CE以雌激素硫酸鈉、馬烯雌酮硫酸鈉和17- α -二氫-馬烯雌酮的總和計算)。

此外將提取的產率以數值形式列出。

15

表I：根據含有結合型雌激素主要的級份的組成對比各方法

	體積	TS	甲酚	17 α -二氫-馬烯雌酮	馬烯雌酮	雌酮	CE			
	[l]	重量%	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	mg	重量% TS	產率
實施例1 - 對比方法										
PMU	7.0	-	329	25.3	57.9	64.9	148.1	1037	-	
E 1	0.2	0.22	0.0	21.2	65.8	76.0	163.0	33	7.46	
E 2	0.2	1.08	0.0	345.9	1093.8	1237.0	2676.7	535	24.77	
E 3	0.2	0.44	0.0	183.4	524.7	607.8	1315.9	263	30.24	
E 4	0.2	0.10	0.0	30.2	58.2	84.6	173.0	35	16.99	
E 5	0.2	0.06	1.6	8.9	7.5	21.1	37.5	8	6.49	
E 2-4 *	0.6	0.54	0.0	186.5	558.9	643.1	1388.5	833	25.71	80%

實施例2a - 在室溫下水/乙酸乙酯為50：50的洗脫液										
PMU	7.0	-	163.0	15.7	41.1	71.1	127.9	895	-	
E 3	0.1	0.29	0.0	90.1	254.8	379.8	724.7	72	24.99	
E 4 W	0.064	2.70	266.0	735.5	1877.7	2858.2	5471.5	350	20.24	
E 5 W	0.053	1.00	188.8	466.9	1233.9	1877.4	3578.2	190	35.84	
E 6 W	0.051	0.50	98.9	245.6	666.9	1015.1	1927.6	98	38.68	
E 7 W	0.051	0.31	57.8	136.2	363.8	551.7	1051.7	54	33.82	
E 8 W	0.051	0.23	33.8	79.6	208.0	314.4	602.0	31	26.27	
E 4-8 *	0.27	1.02	136.1	353.1	921.3	1401.4	2675.8	722	25.91	81%
實施例2b - 在45°C下水/乙酸乙酯為50：50的洗脫液										
PMU	7.0	-	549.1	13.5	61.3	56.3	131.0	917	-	
E 3	0.1	-	31.8	26.6	124.4	122.7	273.7	27	-	
E 4 W	0.086	2.67	0.0	401.9	1719.9	1684.2	3806.0	327	14.25	
E 5 W	0.058	1.49	0.0	519.8	2527.0	2268.4	5315.1	308	35.67	
E 6 W	0.058	0.60	0.0	227.1	878.3	884.1	1989.6	115	33.16	
E 7 W	0.056	0.25	0.0	84.9	350.7	357.9	793.6	44	31.74	
E 8 W	0.053	0.19	0.0	50.4	208.1	204.2	462.8	25	24.36	
E 4-8 *	0.311	1.21	0.0	274.3	1209.3	1152.9	2636.5	820	21.87	89%
實施例3 - 在40°C下水/乙酸乙酯/丙酮為10：10：14的洗脫液										
PMU	7.0	-	266.4	31.9	71.7	91.5	195.0	1365	-	
E 1	0.1	0.30	0.0	58.4	126.2	180.8	365.3	37	12.18	
E 2	0.05	0.28	0.0	75.9	194.2	272.8	542.8	27	19.39	
E 3	0.05	1.40	0.0	794.0	1834.5	2304.5	4933.0	247	35.24	
E 4 W	0.046	4.24	0.0	2300.5	5446.5	6947.8	14694.8	676	34.66	
E 5 W	0.035	1.68	0.0	745.8	1722.8	2165.0	4633.5	162	27.58	
E 6 W	0.035	0.57	0.0	212.5	454.0	548.5	1215.0	43	21.32	
E 7	0.05	0.03	0.0	81.0	166.5	212.0	459.5	23	-	
E 8	0.05	0	0.0	9.6	20.1	25.0	54.7	3	-	
E1-7 *	0.366	1.06	0.0	526.6	1227.0	1563.1	3316.8	1214	31.29	89%
E1-7W	0.34	1.06	0.0	508.0	1146.6	1516.8	3171.4	1078	29.91	79%
E1-7L	0.01	-	0.0	97.0	235.0	340.0	672.0	7	-	
E1-7W 濃縮的	0.044	8.16	0.0	3878	8798	11780	24456	1076	29.97	79%

*)通過計算得出的含量的確定值

例如在實施例1的實驗過程中，即在乙醇洗脫的情形下，一部分異類黃酮，例如馬醇，用鹼性洗滌洗出，一部分異類黃酮，例如7-羥基-4'-甲氧異黃酮，也進入了洗出液，並且只能通過後續的提取而分離。對於其他非結合型親脂化合物也是類似的，例如游離型甾族激素。相反，根據本發明的洗脫方法能夠使柱中仍存在的異類黃酮和游離的甾

族化合物以主要的份額進入任選地濃縮的洗脫液的與水不可混溶的溶劑相，而約達98%的結合型雌激素位元於需要進一步加工的洗出液的水相。所述水相不含非結合型甾族激素並且高度貧化了異類黃酮和類似的非結合型親脂化合物。這一分佈依據實施例2a的第4洗出液的水相和有機相的GC—分析表明於下表中。

表II：結合型雌激素，實施例2a的第4洗脫液的水相和有機相中的游離的甾族激素和7-羥基-4'-甲氧異黃酮(作為異類黃酮的實例)的分佈，GC-分析計算值(該水相在測試前約濃縮1.8倍)：

洗出液4 相	質量 [g]	CE (總)			游離型激素			7-羥基-4'-甲氧異黃酮		
		[mg/g]	[mg]	%份額	[mg/g]	[mg]	%份額	[mg/ml]	[mg]	%份額
水	34.1	9.16	312	97.9	0	0	0	0.027	0.9	45.2
乙酸乙酯	30.5	0.23	7	2.1	0.072	2.1	100	0.037	1.1	54.8

【圖式簡單說明】
(無)

15 【主要元件符號說明】
(無)

五、中文發明摘要：

本發明涉及用於獲取含有結合型牝馬雌激素的天然混合物的提取液的方法。其中通過固相提取法從妊娠牝馬的尿液中獲取結合型雌激素的混合物，該混合物中酚類尿容物和非結合型親脂化合物被貧化，所述非結合型親脂化合物包括非結合型類黃酮、非結合型異類黃酮、非結合型去甲類異戊二烯、非結合型甾族(類固醇)化合物，尤其是雄烷-和孕烷-甾族化合物，以及類似的非結合型化合物。

六、英文發明摘要：

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。 (無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

公告本

第93120985號專利申請案 申請專利範圍修正本 修正日期：100年5月19日

十、申請專利範圍：

1. 一種用於從妊娠牝馬的尿液中獲取結合型雌激素天然混合物的方法，該方法包括

5 a) 將一種尿液，其為未脫除或脫除了粘液物質和固體物質的尿液、經濃縮之該尿液的濃縮物或該尿液經膜過濾而獲得的經濃縮的尿滯留物，與一足夠量的用於吸附尿液中含有的結合型雌激素的混合物的聚合物吸附樹脂接觸，並將經結合型雌激素混合物載入的聚合物吸附樹脂從剩餘的尿液中分離，以及

10 b) 將該經結合型雌激素混合物載入的聚合物吸附樹脂用一pH-值調節到至少為12.0的洗滌用水洗滌，以及

c) 任選地進行中間洗滌步驟，其中用水洗滌該經結合型雌激素混合物載入的聚合物吸附樹脂，以及

15 d) 將經洗滌的吸附樹脂與一足夠量的用於解離所吸附的結合型雌激素混合物的洗脫液接觸，以及

e) 從吸附樹脂上分離含有結合型雌激素之天然混合物的洗出液，並視需要地濃縮，

其特徵在於，

20 所獲取的結合型牝馬雌激素之天然混合物在酚類尿容物和非結合型親脂化合物方面被貧化，該非結合型親脂化合物包括非結合型類黃酮、非結合型異類黃酮、非結合型去甲類異戊二烯、非結合型甾族(類固醇)化合物，以及類似的非結合型化合物，且在方法步驟(d)中作

為洗脫液使用的一單相或二相混合物，其含有

(i) 水，任選地其 pH-值被調節至鹼性範圍內，及

(ii) 至少一與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑，其適用於洗脫選自於上述列舉的非結合型親脂化合物，

及任選地

(iii) 至少一與水可混溶的有機溶劑，其選自與水可混溶的醚類、低級醇類和低級脂族酮類，以及該等溶劑的混合物，

並且

如果在方法步驟 e) 中所獲取的、任選地經濃縮的洗出液為一二相混合物，則在方法步驟 f) 中將所獲取的由二相構成的洗出液中的水相分離，並且獲取含有結合型雌激素之天然混合物的水相並將其任選地濃縮。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中所獲得之該結合型雌激素天然混合物在酚類尿容物與雄烷-和孕烷-甾族化合物方面被貧化。

3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中在該方法步驟 (d) 中作為洗脫液使用的一單相或二相混合物，其含有

(i) 水，任選地其 pH-值被調節至鹼性範圍內，及

(ii) 至少一與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑，其適用於洗脫非結合型親脂化合物，該非結合型親脂化合物包括非結合型類黃酮、非結合型異類黃酮、非結合型去甲類異戊二烯、非結合型甾族化合物，以及類

第 93120985 號專利申請案 申請專利範圍修正本 修正日期：100 年 5 月 19 日

似的非結合型化合物，及

(iii) 至少一與水可混溶的有機溶劑，其選自與水可混溶的醚類、低級醇類和低級脂族酮類，以及該等溶劑的混合物。

- 5 4. 如申請專利範圍第3項之方法，其中於步驟ii)中至少該至少一有機溶劑適用於洗脫雄烷-和孕烷-甾族化合物。
- 5 5. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該適用於洗脫非結
10 合型親脂化合物之與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)係選自呈直鏈的、支鏈的或環狀C₄-C₁₀醇、C₁-C₁₀酯化酸、C₃-C₁₀醛類、C₄-C₁₀酮類、C₃-C₁₀醚類、C₃-C₆腈類和C₁-C₃鹵代烷烴，以及該等溶劑的混合物。
- 15 6. 如申請專利範圍第5項之方法，其中該適用於洗脫非結合型親脂化合物之與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)係選自乙酸-C₁-C₄-烷基酯、丁醇、環己醇、己醇、乙醚、二氯甲烷、甲基叔丁基醚及該等溶劑的混合物。
7. 如申請專利範圍第6項之方法，其中該適用於洗脫非結合型親脂化合物之與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)係選自乙酸-C₁-C₄-烷基酯。
- 20 8. 如申請專利範圍第7項之方法，其中該適用於洗脫非結合型親脂化合物之與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)係選自乙酸乙酯及/或乙酸-異丙酯。
9. 如申請專利範圍第6項之方法，其中該與水可混溶的有機溶劑(iii)係選自丙酮、乙醇和四氫呋喃以及該等溶劑

第 93120985 號專利申請案 申請專利範圍修正本 修正日期：100 年 5 月 19 日
的混合物。

10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該與水可混溶的有機溶劑(iii)是丙酮及／或乙醇。

11. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中該與水可混溶的有機溶劑(iii)是丙酮。

12. 如申請專利範圍第 1 至 6 項中任一項之方法，其中該適用於洗脫非結合型親脂化合物之與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)是乙酸- C_1 - C_4 -烷基酯，且該與水可混溶的有機溶劑(iii)是丙酮及／或乙醇。

13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該適用於洗脫非結合型親脂化合物之與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)是乙酸乙酯及／或乙酸-異丙酯。

14. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該適用於洗脫非結合型親脂化合物之與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)是乙酸乙酯，且該與水可混溶的有機溶劑(iii)是丙酮。

15. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中在該方法步驟(d)中作為洗脫液使用的單相或二相混合物的水(i)及與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)的體積比例在 5：1 至 1：5 的範圍內。

16. 如申請專利範圍第 15 項之方法，其中在該方法步驟(d)中作為洗脫液使用的單相或二相混合物的水(i)及與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)的體積比例在 2：1 至 1：2 的範圍內。

第 93120985 號專利申請案 申請專利範圍修正本 修正日期：100 年 5 月 19 日

17. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中在該方法步驟(d)中作為洗脫液使用的單相或二相混合物的水(i)及與水可混溶的有機溶劑(iii)的體積比例在 4：1 至 1：5 的範圍內。

5 18. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中在該方法步驟(d)中作為洗脫液使用的單相或二相混合物的水(i)及與水可混溶的有機溶劑(iii)的體積比例在 2：1 至 1：3 的範圍內。

10 19. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中在該方法步驟(d)中該作為洗脫液使用的單相或二相混合物的水(i)及該與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)一起相對於與水可混溶的有機溶劑(iii)的體積比例在 5：1 至 1：5 的範圍內。

15 20. 如申請專利範圍第 19 項之方法，其中在該方法步驟(d)中該作為洗脫液使用的單相或二相混合物的水(i)及該與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)一起相對於與水可混溶的有機溶劑(iii)的體積比例在較佳在 2：1 至 1：2 的範圍內。

20 21. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中在該方法步驟(d)中作為洗脫液使用的單相或二相混合物的水(i)相對於該作為與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)應用的乙酸-C₁-C₄-烷基酯，以及相對於該作為與水可混溶的有機溶劑(iii)應用的丙酮及／或乙醇的體積比例在 1：1：1 至 1：1：2 的範圍內。

第 93120985 號專利申請案 申請專利範圍修正本 修正日期：100 年 5 月 19 日

22. 如申請專利範圍第 21 項之方法，其中在該方法步驟(d)

中作為洗脫液使用的單相或二相混合物的水(i)相對於
該作為與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)應用的
乙酸-C₁-C₄-烷基酯，以及相對於該作為與水可混溶的
5 有機溶劑(iii)應用的丙酮及／或乙醇的體積比例在在 1
： 1： 1.4 的範圍內。

23. 如申請專利範圍第 21 項之方法，其中在該方法步驟(d)

中作為洗脫液使用的單相或二相混合物的水(i)相對於
該作為與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)應用的
10 的乙酸乙酯及／或乙酸-異丙酯，以及相對於該作為與
水可混溶的有機溶劑(iii)應用的丙酮及／或乙醇的體積
比例在在 1： 1： 1 至 1： 1： 2 的範圍內。

24. 如申請專利範圍第 21 項之方法，其中在該方法步驟(d)

中作為洗脫液使用的單相或二相混合物的水(i)相對於
15 該作為與水不混溶或幾乎不能混溶的有機溶劑(ii)應用的
乙酸乙酯及／或乙酸-異丙酯，以及相對於該作為與
水可混溶的有機溶劑(iii)應用的丙酮及／或乙醇的體積
比例在在 1： 1： 1.4 的範圍內。

25. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中係使用半極性的吸
20 附樹脂作為該聚合物吸附樹脂。

26. 如申請專利範圍第 25 項之方法，其中係使用非離子型半
極性吸附樹脂作為該聚合物吸附樹脂。

27. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該結合型雌激素天
然混合物從經洗滌的吸附樹脂上的洗脫，是在方法步驟

第 93120985 號專利申請案 申請專利範圍修正本 修正日期：100 年 5 月 19 日

d) 中於 20°C 和 80°C 之間的溫度範圍內進行的。

28. 如申請專利範圍第 27 項之方法，其中該結合型雌激素天然混合物從經洗滌的吸附樹脂上的洗脫，是在方法步驟

d) 中於 30°C 和 50°C 之間的溫度下進行的。