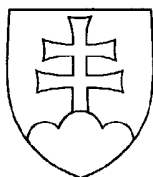


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: **245-99**
- (22) Dátum podania: **30.08.1996**
- (31) Číslo prioritnej prihlášky:
- (32) Dátum priority:
- (33) Krajina priority:
- (40) Dátum zverejnenia: **08.10.1999**
- (45) Dátum zverejnenia udelenia
vo Vestníku: **12.02.2001**
- (86) Číslo PCT: **PCT/EP96/03820, 30.08.1996**

(11) Číslo dokumentu:

281 368

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl⁷:

A 61K 35/22

C 07J 75/00

(73) Majiteľ patentu: Solvay Pharmaceuticals GmbH, Hannover, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: Bán Ivan, Hannover, DE;
Heinemann Henning, Lehrte, DE;
Mechtold Gerhard, Hannover, DE;
Rasche Heinz-Helmer, Burgdorf, DE;

(74) Zástupca: Patentservis Bratislava, a. s., Bratislava, SK;

(54) Názov vynálezu: **Spôsob získavania estrogénov z moču kobýl**

(57) Anotácia:
Spôsob získavania extraktu obsahujúceho prirodzenú zmes konjugovaných estrogénov z moču kobýl sa uskutočňuje extrakciou pevnej fázy zmesi konjugovaných estrogénov z moču žrebných kobýl na neiónových semipolárnych polymérnych adsorpčných živiciach.

Oblasť techniky

Predložný vynález sa týka získania prirodzenej zmesi konjugovaných estrogénov z moču žrebných kobýl.

Doterajší stav techniky

Estrogény sú v lekárstve používané na hormonálnu substitučnú terapiu. Hlavné sú zmesi estrogénov používané na liečbu a prevenciu ťažkostí vyskytujúcich sa u žien v období prechodu po prirodzenej alebo umelej menopauze. Pritom sa prirodzené zmesi konjugovaných estrogénov, ktoré sa vyskytujú v moči žrebných kobýl, ukázali ako obzvlášť účinné a dobre znášateľné.

Rozpustený obsah pevných látok v moči žrebných kobýl (= pregnant mares urine, v nasledujúcom skrátené ako „PMU“) môže kolísť prirodzene v širokých rozsahoch a všeobecne leží v rozsahu 40-90 g sušiny na liter. Okrem močoviny a iných obvyklých látok obsahujúcich moč sú v obsahu pevných látok PMU obsiahnuté fenolické zložky v množstvách cca 2-5 hmotn. % vzťahnuté na sušinu. Medzi týmito fenolickými zložkami sa nachádzajú krezoly a ako HPMF známe dihydro-3,4-bis[3hydroxyfenyl)metyl]-2(3H)-furanón. Tieto látky sa môžu vyskytovať vo voľnej alebo konjugovanej forme. V PMU je obsiahnutá prirodzená zmes estrogénov, ktorá ďalekosiahlo existuje v konjugovanej forme, napr. ako sodná soľ poloesteru kyseliny sírovej (v nasledujúcom skrátené ako „sulfátová soľ“). Obsah konjugovaných estrogénov (vypočítaný ako sulfátová soľ estrogénov) môže byť medzi 0,3 a 1 hmotn. % vzťahnuté na sušinu.

Zvyčajne sú extrakty z PMU obsahujúce konjugované estrogény získavané extrakciou pomocou polárnych, s vodou sa nemiešateľných alebo len málo miešateľných organických rozpúšťadiel, ako sú napr. etylester kyseliny octovej, n-butanol alebo cyklohexanol. Pri takých extrakciách kvapalina-kvapalina sa však vyskytuje veľký počet problémov, ako je silná tvorba peny, tvorba sedimentu, tvorba emulzie a zlé delenie fáz. Všeobecne je potrebné viac extrakčných krokov, čo vedie ku stratám a iba k čiastočnému získaniu obsahu estrogénov.

Von H- L. Bradlowom bolo roku 1968 (pozri Steroidy II (1968), 265-272) navrhnuté na extrakciu konjugovaných estrogénov z moču použitie Amberlitu 2 XAD-2^R, neutrálne nepolárne hydrofóbne polyesterové živice firmy Rohm a Haas. Uvedená kapacita adsorpcie je malá. Podľa Bradlowa sa eventuálne riešený moč vedie s nízkou prietokovou rýchlosťou cez stĺpec obsahujúci danú živicu. Estrogény sú eluované metanolom alebo etanolom. Nie sú však urobené žiadne údaje o ostatných látkach obsiahnutých v eluáte obsahujúcom estrogény.

Podstata vynálezu

Úlohou tohto vynálezu je vyvinúť technický postup na získanie prirodzenej zmesi konjugovaných estrogénov z PMU, pričom by sa zabránilo známym nevýhodám doposiaľ zvyčajných extrakcií kvapalina-kvapalina, a ktorý dodáva produkt obohatený fenolickými, moč obsahujúcimi látkami a ďalekosiahle zbvavený krezolov a HPMF. Teraz bol nájdený postup, ktorým môže byť v jednej extrakcii pevnej látky na neiónovej semipolárnej polymérnej adsorpcnej živici získaná zmes obohatená fenolickými, moč obsahujúcimi látkami, ktorá je ďalekosiahle zbvavená krezolov a HPMF, avšak prakticky úplne obsahuje prirodzený obsah

estrogénov v PMU, ktorá môže slúžiť ako východiskový materiál na výrobu farmaceutík obsahujúcich prirodzenú zmes konjugovaných estrogénov z PMU ako účinnú zložku.

Postup podľa vynálezu na získanie fenolickými, moč obsahujúcimi látkami obohatenej prirodzenej zmesi konjugovaných estrogénov z PMU je založený na tom, že

- a) sa močová kvapalina, ktorá predstavuje moč zbvavený slizovitých a pevných látok, zúžený koncentrát tohto moču alebo zúžený močový retenát získaný membránovou filtráciou tohto moču, kontaktuje s príslušným množstvom semipolárnej polymérnej adsorpcnej živice, ktoré je dostatočné na adsorpciu zmesi konjugovaných estrogénov obsiahnutej v močovej kvapaline, a sa oddeľuje zmesou konjugovaných estrogénov nasýtená semipolárna polymérna adsorpcná živica od ostatnej močovej kvapaliny,
- b) sa semipolárna polárna adsorpcná živica nasýtená zmesou konjugovaných estrogénov premyva pracou vodou upevnenou na pH minimálne 12,0, hlavne 12,5 - 14,
- c) sa premytá adsorpcná živica kontaktuje na desorpciu adsorbovanej zmesi konjugovaných estrogénov s dostatočným množstvom elučnej kvapaliny, ktorá predstavuje s vodou miešateľné organické rozpúšťadlo zo skupiny s vodou miešateľným éterom, nižších alkanolov a nižších alifatických ketónov alebo zmes z organického rozpúšťadla miešateľného s vodou a z eventuálne alkalicky upravenej vody, eluát obsahujúci prirodzenú zmes konjugovaných estrogénov od adsorpcnej živice sa oddelí a prípadne koncentruje.

Pre daný postup podľa vynálezu môže byť používaný PMU ako taký, z neho koncentrovaný získaný koncentrát alebo membránovou filtráciou získaný retenát. Nazhromaždený moč sa najprv známym spôsobom zbaví slizovitých a pevných látok. Ako účelné sa ukazuje usadzovanie pevných a slizovitých látok a tieto sa potom oddelia známymi deliacimi spôsobmi, napr. dekantáciou, separáciou a/alebo filtráciou. Tak môže byť PMU napr. vedený cez známe deliace zariadenie, napr. cez separátor, filtračné zariadenie alebo sedimentačné zariadenie. Ako deliace zariadenie môže slúžiť napr. pieskové lôžko alebo môžu byť použité obchodne bežné separátory, napr. dýzové alebo komorové separátory. Vhodné môžu byť rovnako mikrofiltračné zariadenie alebo ultrafiltračné zariadenie, pri použití ktorých môže byť súčasne dosiahnuté ďalekosiahle zbvavenie zárodkov a vírusov filtrovaného PMU.

Výhodne môžu byť do moču pridávané konzervačné prostriedky, dezinfekčné prostriedky (germicídy), baktericídy a/alebo anthelmintiká.

Pokiaľ miesto PMU má byť použitý skoncentrovaný PMU-retenát, môže byť tento získavaný z PMU pomocou známej membránovej filtrácie. Obsah pevných látok retenátu a jeho zloženie sa môžu meniť podľa použitého PMU a membrány použitej na membránovú filtráciu. Napr. pri použití nanofiltračnej membrány môže byť dosiahnuté takmer bezstratové koncentrovanie obsahu estrogénu v PMU-retenáte pri súčasnom odstránení až 50 hmotn. % nízkomolekulárneho PMU. Pre daný postup podľa vynálezu môžu byť použité PMU-retenáty, ktoré boli skoncentrované až na pomer cca 1 : 10, lepšie na pomer cca 1 : 7, a ktorých objem môže byť zúžený až na cca 1/10, prednostne 1/7, pôvodného objemu PMU.

Semipolárnymi polymérnymi adsorpcnými živiciami, použiteľnými v kroku a) daného postupu, sú porézne organické neiónové polyméry, ktoré majú oproti nepolárnym hydrofóbnym polymérnym adsorpcným živiciam prechodovú polaritu (= napr. s dipólovým momentom aktívneho povrchu živice v rozsahu od 1,0 do 3,0, obzvlášť od 1,5 do 2,0 Debye) a trochu hydrofilnejšiu štruktúru, napr. živica z

esterov polykarbónových kyselín. Účelne sú použité makroporézne semipolárne živice s prednostne makroretikulárnou (sieťovo usporiadanou) štruktúrou a s priemernými priemerami pórov v rozsahu od 50 do 150, prednostne 70 až 100 Angströmov, a špecifickým povrchom v rozsahu od 300 do 900, prednostne od 400 do 500 m²/g. Ako obzvlášť vhodnými sa ukazujú makroporézne, priečne sieťované alifatické živice z esterov polykarbónových kyselín, hlavne priečne sieťované živice z polyakrylesterov, ako je napr. Amberlite XAD-7R firmy Rohma a Haasa.

Podľa vynálezu môže adsorpcia konjugovaných estrogénov na semipolárnej adsorpcnej živici prebiehať kontaktovaním PMU alebo jeho retanátu s adsorpcnou živcou, keď sa močová kvapalina zaviede do reaktora obsahujúceho adsorpcnú živicu a je s ňou udržiavaná v kontakte v priebehu času dostatočného na adsorpciu príslušného obsahu estrogénu. Po uskutočnenej adsorpcii konjugovaných estrogénov na semipolárnu adsorpcnú živicu môže byť adsorpcná živica, nasýtená zmesou konjugovaných estrogénov, oddelená známym spôsobom od ostatnej močovej kvapaliny. Účelnejšie môže byť močová kvapalina vedená stĺpcom obsahujúcim danú adsorpcnú živicu takou prietokovou rýchlosťou, že kontaktný čas postačí na adsorpciu daného obsahu estrogénov. Vhodné sú napr. prietokové rýchlosti, ktoré zodpovedajú prietoku od 3 do 10, prednostne od 5 do 7 objemových dielov PMU/1 objemový diel adsorpcnej živice za hodinu. Adsorpcia je vykonávaná prednostne pri teplote miestnosti. Účelne môže byť prietoková rýchlosť močovej kvapaliny riadená reaktorom prácami pri malom pretlaku alebo podtlaku. Množstvo aplikovanej semipolárnej adsorpcnej živice sa môže meniť podľa druhu použitej adsorpcnej živice a množstva obsahu pevných látok v močovej kvapaline. Pri použití PMU môže byť príkladne jeden objemový diel adsorpcnej živice, napr. priečne zosietenej alifatickej adsorpcnej živice z esterov polykarbónových kyselín, napojený až 80 objemovými dielmi vopred spracovaného PMU bez toho, aby boli preukázateľné viditeľné množstvá estrogénu v odtekajúcej močovej kvapaline. Pri použití koncentráta alebo retanátu PMU sa zaťažovacia kapacita adsorpcnej živice redukuje prirodzene v tej miere, v ktorej sú tieto skoncentrované. Tak môže byť napr. 1 objemový diel priečne zosietenej alifatickej adsorpcnej živice z esterov polykarbónových kyselín napojený množstvom močovej kvapaliny zodpovedajúcim 20 až 80, prednostne 30 až 50, objemovým dielom PMU.

Semipolárna adsorpcná živica nasýtená zmesou konjugovaných estrogénov sa v postupovom kroku b) premýva pracou vodou upravenou na pH minimálne 12,0, hlavne od 12,5 do 14, prednostne cca od 12,5 až 13,5. Ako pracia voda môžu byť použité vodné roztoky inertných zásaditých látok rozpustných v močovej kvapaline, ktoré sú dostatočne silné, aby boli dosiahnuté hodnoty pH aspoň 12,5. Oproti semipolárnej polymérnej adsorpcnej živici, sa ako inertné, vodorozpustné zásadité látky hodia prednostne vodorozpustné anorganické zásady, ako sú hydroxidy alkalických kovov alebo hydroxidy kovov alkalických zemín, hlavne hydroxid sodný. Účelne obsahuje pracia voda len zhruba také množstvo zásaditých látok, ktoré sú potrebné na dosiahnutie žiaducej hodnoty pH, prednostne cca 13. Množstvo práce vody je zvolené tak, aby bolo dostatočné na ďalekosiahle odstránenie fenolických látok obsahujúcich moč bez toho, aby pritom bolo vymyté za zmienku stojacie množstvo konjugovaných estrogénov.

Ako účelne sa ukazuje napr. použitie od 2 do 10, hlavne od 4 do 6, ložných objemov premývavej kvapaliny na jeden ložný objem adsorpcnej kyseliny. Prítom sa pracia voda účelne vedie reaktorom obsahujúcim adsorpcnú živicu s

prietokovou rýchlosťou od 3 do 10, prednostne od 5 do 7, objemových dielov práce vody/1 objemový diel adsorpcnej živice za hodinu.

V kroku daného postupu c) sa nakoniec spracuje premytá adsorpcná živica nasýtená zmesou konjugovaných estrogénov s množstvom elučnej kvapaliny, ktoré je dostatočné na elúciu zmesi konjugovaných estrogénov, a získa sa eluát obsahujúci prirodzenú zmes konjugovaných estrogénov PMU. Podľa vynálezu používaná elučná kvapalina predstavuje s vodou miešateľné organické rozpúšťadlo zo skupiny s vodou miešateľných éterov, nižších alkanolov a nižších alifatických ketónov alebo zmes z takého s vodou miešateľného rozpúšťadla a eventuálne alkalicky upravenej vody. Ako éterické zložky sa hodia s vodou miešateľné cyklické étery ako tetrahydrofurán alebo dioxán, ale tiež s vodou miešateľné étery s otvoreným reťazcom ako napr. ctylén glykoldimetyléter (=Monoglyme), dietylén glykoldimetyléter (=Diglyme) alebo etyloxyetyloxyetanol (=karbitol). Ako nižšie alkoholy sa hodia s vodou miešateľné alkylalkoholy s 1 - 4, prednostne 1 - 3, atómami uhlíka, hlavne etanol alebo izopropanol. Ako nižšie alifatické ketóny sa hodia s vodou miešateľné ketóny s 3 - 5 uhlíkovými atómami, hlavne acetón. Ako obzvlášť priaznivé sa ukazujú elučné kvapaliny, v ktorých je organickým rozpúšťadlom etanol. Účelne sú ako elučné kvapaliny používané zmesi z vopred menovaných a s vodou miešateľných organických rozpúšťadiel a eventuálne alkalicky upravenej vody. Hodnota pH takých vodu obsahujúcich elučných činidiel leží v neutrálnej až alkalickej oblasti až do pH 13 a môže prednostne byť cca 10 až 12. Ako rozpúšťadlová zložka vo vode obsahujúcej elučnej kvapaline je volené rozpúšťadlo stabilné v používanej oblasti pH. Vo vodu obsahujúcich alkalických elučných kvapalinách s hodnotami pH cca 10 až 12 sa hodia ako rozpúšťadlové zložky nižšie alkoholy, prednostne etanol. Žiadaná hodnota pH vodnatého elučného činidla sa nastavuje pridaním zodpovedajúceho množstva vodorozpustnej inertnej zásaditej látky, prednostne anorganickej zásady, napr. hydroxidu alkalického kovu alebo hydroxidu kovu alkalických zemín, hlavne hydroxidu sodného. Vo vodnatých elučných kvapalinách môže objemový pomer s vodou miešateľného organického rozpúšťadla s vodou ležať v rozsahu od 40 : 60 do 20 : 80, prednostne cca 30 : 70. Použitie množstvo elučného činidla môže byť cca 3 až 10, hlavne cca 4 až 6 jeho objemu na príslušný objem adsorpcnej živice. Vhodnejšie sa elučné kvapalina vedie reaktorom obsahujúcim zmesou estrogénov napojenú adsorpcnú živicu takou prietokovou rýchlosťou, aby kontaktný čas postačoval na úplnú elúciu zmesi konjugovaných estrogénov. Pri použití zmesi etanolu s vodou v objemovom pomere 30 : 70 sa hodia príkladne prietokové rýchlosti od 3 do 10, prednostne od 5 do 7, objemových dielov elučnej kvapaliny na 1 objemový diel adsorpcnej živice za hodinu. Účelne sa vykonáva elúcia v teplotnom rozsahu teploty miestnosti cca do 60 °C, prednostne pri cca 40 až 50 °C. V žiaducom prípade sa prietoková rýchlosť reguluje prácou pri ľahko zvýšenom tlaku, napr. pri pretlaku až do 0,2 bar a eluát sa zachytáva v niekoľkých frakciách. Obsahy jednotlivých eluátových frakcií konjugovaných estrogénov a fenolických, v moči obsiahnutých látok, ako sú krezoly a HPMF môžu byť určené známym spôsobom pomocou vysokovýkonnej kvapalinovej chromatografie (=high performance liquid chromatography, skrátene ako „HPLC“).

Pri elúcii sa najprv získa slabo zafarbená až bezfarebná, prakticky estrogény neobsahujúca predkvapová frakcia, ktorej množstvo zodpovedá všeobecne cca jednému ložnému objemu. Hlavné množstvo konjugovaných estrogénov,

príkladne medzi 80 a 99 % konjugovaných estrogénov existujúcich vo východiskovej PMU (v moči zrebných kobýl), sa nachádza v nasledujúcich, tmavožlté až hnedo zafarbených hlavných eluátových frakciách, ktorých množstvo zahŕňa všeobecne 2 až 4 ložné objemy. V nasledujúcich dokvapových zadných frakciách sú všeobecne obsiahnuté už len stopy konjugovaných estrogénov. Pokiaľ sú získané zadné frakcie, ktoré obsahujú ešte konjugované estrogény nad 10 hmotn. % vztiahnuté na sušinu a menej než 0,6 hmotn. % krezolov a HPMF vztiahnuté na sušinu, môžu byť tieto frakcie spojené s hlavným eluátom bohatým na estrogény na ďalšie spracovanie.

Hlavný eluát oddelený opísaným spôsobom od adsorpčnej živice obsahuje v PMU sa vyskytujúcu prirodzenú zmes konjugovaných estrogénov vedľa len malého podielu pôvodne v PMU prítomného obsahu fenolických, v moči obsiahnutých látok. Tento eluát môže slúžiť ako východiskový materiál na výrobu liečiv obsahujúcich prirodzenú zmes konjugovaných estrogénov. Ak je to žiaduce, môže byť eluát ďalej zúžený známym spôsobom, aby bol získaný koncentrát ďaleko zbavený organických rozpúšťadiel, ktorý je vhodný na ďalšie galenické spracovanie. V žiaducom prípade môže byť tiež sušením rozprašovaním vyrobená zmes pevných látok zbavená elučného činidla. Pokiaľ má byť prirodzená zmes konjugovaných estrogénov použitá na výrobu pevných liekov, môže byť vhodné prmiešať k eluátu obsahujúcemu konjugované estrogény ešte pred koncentrovaním alebo sušením rozprašovaním pevný nosič, aby sa týmto spôsobom získala zmes pevných látok obsahujúca konjugované estrogény a nosiče. Ako eluát obsahujúci zmes estrogénov, tak z toho vyrobený koncentrát alebo rozprašovaním vysušený pevný produkt môžu byť známym spôsobom zapracované do pevných alebo kvapalných galenických prípravkov ako napr. tabliet, dražé, kapsúl alebo emulzií. Tieto galenické prípravky môžu byť vyrábané podľa známych spôsobov s použitím zvyčajných pevných alebo kvapalných nosičov ako napr. škrobu, celulózy, mliečného cukru (laktózy) alebo mastenca alebo kvapalných parafínov a/alebo s použitím obvyklých farmaceutických pomocných látok napr. napučievadiel tabliet, rozpúšťacích alebo konzervačných prostriedkov. Tak môže byť produkt obsahujúci konjugované estrogény zmiešaný známym spôsobom s farmaceutickými nosičmi a pomocnými prostriedkami a daná zmes môže byť vyhotovená do vhodného dávkovacieho tvaru.

Nasledujúce príklady majú bližšie vysvetliť daný vynález, avšak bez toho, aby bol obmedzený jeho rozsah.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklady 1 - 3

Všeobecný pracovný predpis na získanie extraktu z PMU obsahujúceho prirodzenú zmes v PMU obsiahnutých konjugovaných estrogénov, ktoré sú ďalekosiahlo obohatené fenolickými látkami obsiahnutými v moči.

A) Adsorpcia obsahu estrogénu PMU na semipolárnej adsorpčnej živici z polyakrylesterov

Stĺpec s výškou 30 cm s priemerom 2,4 cm je naplnený 65 ml vo vode napučanou semipolárnou polyakrylesterovou adsorpčnou živicom (= Amberlite XAD-7 firmy Rohm a Haas, s veľkosťou zrn 0,3 až 1,2 mm, dipólmomentom 1,8 Debye, priemerným priemerom pórov 80 Angstrómov a špecifickým povrchom cca 450 m²/g v suchom stave). 21 PMU filtrované mikrofiltračným zariadením alebo čistené vedením cez separátor (obsah sušiny (=TS) a tiež pomocou

HPLC určené obsahy estrónsulfátovej soli, krezolu a HPMF, pozri nasledujúcu tabuľku) sú pri teplote miestnosti vedené prietokovou rýchlosťou 6 ml/min. (=cca 5,5 ložného objemu za hodinu) cez daný stĺpec. Obsah estrogénov PMU je adsorbovaný úplne na takto napojenom stĺpci semipolárnej adsorpčnej živice. Prebehnutá močová kvapalina je vyšetrovaná pomocou HPLC na obsah konjugovaných estrogénov (vypočítaný ako estrónsulfátová soľ) a ukazuje sa ako prakticky zbavená obsahu estrogénov. Kvapalina pretečená stĺpcom je odstránená.

B) Premývanie napojeného stĺpca s adsorpčnou živicom

Napojený stĺpec adsorpčnej živice je premytý 300 ml vodného roztoku hydroxidu sodného pri pH uvedenom v tabuľke. Okrem toho sa daným stĺpcom vedie alkalická pracia voda s prietokovou rýchlosťou 6 ml/min. (=cca 5,5 ložného objemu za hodinu). Pracia kvapalina, ktorá prešla, je vyšetrovaná pomocou HPLC na obsah estrónsulfátovej soli, krezolu a HPMF. Vyšetrenie ukázalo, že počas vymývacej fázy sa premyje menej než 5% všetkých estrogénov zachytených v stĺpci.

C) Desorpcia konjugovaných estrogénov z premytého stĺpca adsorpčnej živice

315 ml elučnej kvapaliny (pridaním hydroxidu sodného k zmesi alkalicky upravenej vody a rozpúšťadla, zloženie a pH pozri nasledujúcu tabuľku) je vedené prietokovou rýchlosťou cca 6 ml/min. stĺpcom predhriatym na elučnú teplotu uvedenú v danej tabuľke. Eluát, ktorý prešiel, je zachytený do 6 frakcií. Prvá frakcia tvorí cca 65 ml (=cca 1 ložný objem), zvyšné frakcie tvoria vždy cca 50 ml. Jednotlivé frakcie sú vyšetrené pomocou HPLC na obsah estrónsulfátovej soli, krezolu a HPMF. Prvá frakcia sa zhromažďuje, pokiaľ sa eluát javí ako bezfarebný až slabo žltý. Táto frakcia obsahuje iba stopy estrónsulfátovej soli.

Po prebehnutí prvého ložného objemu eluátu dochádza ku zmene farby eluátu na intenzívny tmavohnedý farebný tón. V nasledujúcich frakciách 2 až 4 sú potom obsiahnuté cca 80 až 98 % všetkého množstva konjugovaných estrogénov adsorbovaných na stĺpci. Zvyšné frakcie obsahujú už len malé množstvo estrónsulfátovej soli. To je rovnako značne viditeľné na poklese farebnej intenzity. Prípadne môžu byť zvyšné frakcie po oddestilovaní daného rozpúšťadla pridané ešte ku kroku A).

Pre frakcie obsahujúce hlavné množstvo konjugovaných estrogénov sú v nasledujúcej tabuľke obsiahnuté vždy obsah sušiny (TS) v hmotn. % a obsahy estrogénsulfátu, krezolu a HPMF určené pomocou HPLC. Tieto frakcie obsahujú extrakty vhodné na ďalšie galenické spracovanie.

D) Regenerácia stĺpca adsorpčnej živice

Na regeneráciu sa daný stĺpec premyje najprv 100 ml zmesi etanol/voda obsahujúcej 50 % etanolu a upravenej na pH 12, potom sa 150 ml vodného 10 %-ného roztoku citrónu amónneho a ešte so 150 ml zmesou etanol/voda a nakoniec so 100 ml destilovanej vody. Celková regenerácia prebieha pri teplote 45 °C. Stĺpec môže byť viackrát, príkladne až 40-krát, nasýtený a znovu regenerovaný.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Postup na získanie fenolickými, v moči obsiahnutými látkami obohatenej prirodzenej zmesi konjugovaných estrogénov z moču zrebných kobýl, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m , ž e**

a) močová kvapalina, ktorá predstavuje moč zbavený slizovitých a pevných látok, zúžený koncentrát tohto moču alebo membránovou filtráciou tohto moču získaný zúžený močový retenát, sa kontaktuje s množstvom neiónovej semipolárnej polymérnej adsorpčnej živice dostatočným na adsorpciu zmesi konjugovaných estrogénov obsiahnutej v močovej kvapaline a semipolárna polymérna adsorpčná živica s naadsorbovanou danou zmesou konjugovaných estrogénov sa oddeľuje od ostatnej močovej kvapaliny,

b) neiónová semipolárna polymérna adsorpčná živica s naadsorbovanou zmesou konjugovaných estrogénov sa premyva pracou vodou upravenou minimálne na pH 12 a

c) premytá adsorpčná živica sa kontaktuje s takým množstvom elučnej kvapaliny, ktoré je dostatočné na desorpciu adsorbovanej zmesi konjugovaných estrogénov, pričom táto kvapalina predstavuje s vodou miešateľné organické rozpúšťadlo zo skupiny s vodou miešateľných éterov, nižších alkanolov a nižších alifatických ketónov alebo zmes z organického rozpúšťadla miešateľného s vodou a eventuálne alkalicky upravenej vody, eluát obsahujúci prirodzenú zmes konjugovaných estrogénov sa od adsorpčnej živice oddelí a prípadne koncentruje.

2. Postup podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že v kroku a) je ako neiónová semipolárna adsorpčná živica použitá makroporézna živica z esterov polykarbónových živíc.

3. Postup podľa nároku 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že ako živica z esterov polykarbónových kyselín je použitá priečne sieťovaná alifatická živica esteru polykarbónovej kyseliny, prednostne priečne sieťovaná polyakryl-esterová živica s prednostne makroretikulárnou štruktúrou.

4. Postup podľa jedného z predchádzajúcich nárokov, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa v postupovom kroku a) l objemový diel neiónovej semipolárnej adsorpčnej živice nasýti množstvom močovej kvapaliny zodpovedajúcim 20 až 80, prednostne 30 až 50, objemovým dielom moču.

5. Postup podľa jedného z predchádzajúcich nárokov, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že v kroku a) sa močová kvapalina vedie reaktorom obsahujúcim neiónovú semipolárnu polymérnu adsorpčnú živicu prietokovou rýchlosťou, ktorá zodpovedá prietoku 3 až 10, prednostne 5 až 7 objemových dielov moču/1 objemový diel adsorpčnej živice za hodinu.

6. Postup podľa jedného z predchádzajúcich nárokov, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že v kroku b) použitá pracia voda je vodným roztokom hydroxidu sodného upraveného na pH cca 12,5 až 13,5.

7. Postup podľa jedného z predchádzajúcich nárokov, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že v kroku c) je ako elučná kvapalina použitá zmes z vody a s vodou miešateľného organického rozpúšťadla s objemovým pomerom organického rozpúšťadla k vode v rozsahu 20 : 80 až 40 : 60, hlavne 30 : 70.

8. Postup podľa jedného z predchádzajúcich nárokov, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že v postupovom kroku c) je použitá elučná kvapalina obsahujúca etanol.

Koniec dokumentu
