



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **331790**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 35/22 (2006.01)

A61K 31/56 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 15/12 (2006.01)

B01J 20/26 (2006.01)

B01J 20/34 (2006.01)

C07J 75/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20042761	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.11.27 PCT/EP2002/13343
(22)	Inng.dag	2004.06.30	(85)	Videreføringsdag	2004.06.30
(24)	Løpedag	2002.11.27	(30)	Prioritet	2001.12.01, DE, 10159161
(41)	Alm.tilgj	2004.06.30			
(45)	Meddelt	2012.04.02			
(73)	Innehaver	Solvay Pharmaceuticals GmbH, Hans-Böckler-Allee 20, DE-30173 HANNOVER, Tyskland			
(72)	Oppfinner	Heinz-Helmer Rasche, Zilleweg 54, DE-31303 BURGDORF, Tyskland			
		Olaf Rupp, Im Fump 6, DE-31553 AUHAGEN, Tyskland			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for utvinning av en naturlig blanding av konjugerte østrogener som er utarmet på fenoliske urininnholdsstoffer, fra urinen til drektige hopper.			
(56)	Anførte publikasjoner	H. LEON BRADLOW, "Extraction of steroid conjugates with a neutral resin", Steroids, vol. 11, no. 3, 1968, s. 265-272, XP002030905, WO 9808526 A1			
(57)	Sammendrag				

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for utvinning av ekstrakter av en naturlig blanding av konjugerte østrogener fra urinen til drektige hopper (PMU). Ekstraktene utvunnet i henhold til fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen oppfyller den farmasøytiske spesifikasjon vedrørende konjugert østrogen og minimalisering av innholdet av fritt østrogen, selv når det anvendes PMU som er gammel og/eller lagret eller transportert ved en høy temperatur. PMU-ekstrakter som inneholder en blanding av konjugerte østrogener, fås ved hjelp av fastfaseekstraksjon på semipolare adsorpsjonsharpikser.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører utvinning av en naturlig blanding av konjugerte østrogener fra urinen til drektige hopper.

Østrogener anvendes innen medisinen til hormonsubstitusjonsterapi. Særlig anvendes østrogenblandinger til behandling og profylakse av det ubehag som opptrer hos kvinner i overgangsalderen etter naturlig eller kunstig menopause. Her har naturlige blandinger av konjugerte østrogener som finnes i urinen til drektige hopper, vist seg som særlig aktive og godt akseptable.

Det oppløste faststoffinnhold i urinen til drektige hopper (= "pregnant mares urine", i det følgende forkortet som "PMU") kan naturligvis variere innenfor brede områder og ligger generelt i et område fra 40 til 90 g tørrstoff pr. liter. Ved siden av urinstoff og øvrige vanlige innholdsstoffer i urin finnes det i faststoffinnholdet til PMU fenoliske bestanddeler i mengder fra ca. 2 til 5 vekt % regnet på tørrstoffet. Blant disse fenoliske bestanddelene befinner seg kresol og det som HPMF kjente dihydro-3,4-bis[(3-hydroksyfenyl)metyl]-2-(3H)-furanon. Disse kan foreligge i fri eller konjugert form. I PMU finnes det en naturlig blanding av østrogener som stort sett foreligger i konjugert form, f.eks. som svovelsyrehalvesternatriumsalt (i det etterfølgende forkortet som "sulfatsalt"). Innholdet av konjugerte østrogener (betegnet som østrogensulfatsalt) kan utgjøre mellom 0,3 og 1 vekt % beregnet på tørrstoffet.

Fra H. Leon Bradlow i Steroids, vol 11, no. 3, 1968, s. 265-272, er det kjent en forbedret metode for ekstraksjon av steroidkonjugater fra urin. Konjugatene adsorberes til en nøytral kryssbundet polystyrenpolymer (Amberlite XAD-2) og elueres med metanol eller etanol.

Fra WO 98/08526 er det allerede kjent en egnet fremgangsmåte med hvilken, i en fastfaseekstraksjon på en semipolar, særlig ikke-ionisk semipolar polymer adsorpsjonsharpiks, en blanding som er utarmet på fenoliske urininnholdsstoffer, langt på vei kresol- og HPMF-fri, som inneholder praktisk talt fullstendig det naturlige østrogeninnhold til PMU, kan utvinnes. Denne ekstrakten egner seg som utgangsmateriale for utvinning av farmasøytika som inneholder den naturlige blanding av konjugerte østrogener som aktive komponenter.

For å kunne anvendes som aktive komponenter for farmasøytika, må den utvunne naturlige blanding av konjugerte østrogener imidlertid oppfylle bestemte farmasøytiske spesifikasjoner, f. eks. den spesifikasjon som er fastlagt i USP (United States Pharmacopeia) eller den europeiske farmakopé. Dessuten bør innholdet av frie østrogener beregnet på tørrstoffet ikke overstige bestemte grenseverdier. Normalt oppfylles de fastlagte farmasøytiske spesifikasjonskrav av blandingen av konjugerte østrogener som utvinnes fra PMU ved fremgangsmåten ifølge WO 98/08526.

Det har imidlertid vist seg at de nødvendige farmasøytiske spesifikasjoner, f.eks. den ovenfor nevnte grenseverdi for det maksimalt tolererbare innhold av frie østrogener, da ofte ikke kan være inneholdt når en "aldret" urin, f.eks. en PMU som har

vært lagret over lengre tid og/eller henholdsvis transportert ved forhøyede temperaturer, til utvinning av den naturlige blanding av konjugerte østrogener. Denne endringen i PMU kan sannsynligvis tilbakeføres til at innholdet av konjugerte østrogener kan reduseres med tiden eller ved forhøyede temperaturer, alt etter lagrings- og/eller transportbetingelsene, mens innholdet av uønskede frie østrogener derved øker. Den opprinnelige sammensetning av den naturlige blanding av østrogener kan således være forandret på skadelig måte i den aldret urin i forhold til frisk urin. For den ved fremgangsmåten ifølge

WO 98/08526 utvinne, naturlige blanding av konjugerte østrogener er det ofte en fare ved eventuelt forandret sammensetning i et aldret utgangsprodukt at den utvinne ekstrakt ikke lenger kan oppfylle de nødvendig farmasøytiske spesifikasjoner, særlig det maksimalt tolererbare innhold av frie østrogener. En særlig ulempe ved dette er det at den i og for seg verdifulle aktivstoffekstrakt av blandingen av konjugerte østrogener utvunnet fra påfyllninger av aldret PMU, ikke lenger kan anvendes til fremstilling av et farmasøytisk preparat, og således må kastes. Tapet av et verdifullt, naturlig farmasøytisk aktivt stoff er med hensyn til den kostbare oppsamling av PMU som bare kan forestas i bestemte perioder av drektigheten, og de dermed forbundne logistiske begrensningsbetingelser, i praksis og ut fra vitenskapelige synspunkter i høy grad ikke tilfredsstillende.

Oppgaven til den foreliggende oppfinnelse er således å utvikle en teknisk og økonomisk optimal fremgangsmåte for utvinning av en naturlig blanding av konjugerte østrogener som er utarmet på fenoliske urininnholdsstoffer, fra PMU, idet det som utgangsprodukt også kan anvendes aldret PMU, det vil si PMU som er lagret eller transportert over lengre tidsrom og/eller ved forhøyede temperaturer, som eventuelt kan oppvise en forhøyet andel av frie østrogener, uten utvelgelse, og idet den naturlige blanding av konjugerte østrogener utvunnet fra denne PMU oppviser gode innhold av aktiv forbindelse, og oppfyller den nødvendige farmasøytiske spesifikasjon, særlig også med hensyn til det maksimalt tolererbare innhold av frie østrogener.

Det ble nå funnet frem til en fremgangsmåte hvorved det på overraskende enkel måte kan utvinnes en blanding av konjugerte østrogener også fra aldret, det vil særlig fra en PMU som kan oppvise en eventuelt forhøyet andel av frie østrogener, hvorved den utvinne blanding oppviser konjugerte østrogener med en høy produktkvalitet, og som sikkert oppfyller alle krav til farmasøytisk spesifikasjon, særlig også med hensyn til det maksimalt tolererbare innholdet av frie østrogener.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen går ut fra den i WO 98/08526 beskrevne fremgangsmåte som tjener til utvinning av en naturlig blanding av konjugerte østrogener som er utarmet på fenoliske urininnholdsstoffer, fra PMU. Således vedrører oppfinnelsen en fremgangsmåte for utvinning av den naturlige blanding av konjugerte

østrogenener som er utarmet på fenoliske urininnholdsstoffer, fra urinen til drektige hopper, hvorved man

a) fremstiller en urinvæske som utgjøres av en urinvæske som eventuelt er befridd for slim- og faststoffer, et inndampet konsentrat av denne urinvæsken eller et inndampet urinretentat erholdt ved membranfiltrering av denne urinvæsken, bringer den i kontakt med en tilstrekkelig mengde av en semipolar polymer adsorpsjonsharpiks for absorpsjon av blandingen og konjugerte østrogenener som er inneholdt i urinvæsken, og fraskiller en semipolar adsorpsjonsharpiks som er ladet med blandingen av konjugerte østrogenener, fra den øvrige urinvæske,

b) vasker den semipolare polymere adsorpsjonsharpiks som er ladet med blandingen av konjugerte østrogenener, med et vaskevann som er innstilt på et pH-område på minst 12,0, særlig på 12,5 til 14,0,

c) bringer den vaskede adsorpsjonsharpiks i kontakt med en for desorpsjon av den der adsorberte blanding av konjugerte østrogenener tilstrekkelig mengde av en elueringsvæske som utgjøres av et med vann blandbart organisk oppløsningsmiddel fra gruppen av etere, lavere alkanoler og lavere alifatiske ketoner som er blandbare med vann, eller en blanding av det med vann blandbare organiske oppløsningsmiddel og eventuelt alkalisk innstilt vann, og utskiller og eventuelt inndamper et eluat som inneholder den naturlige blanding av konjugerte østrogenener, fra adsorpsjonsharpiksen, idet fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen utmerker seg overfor fremgangsmåten ifølge teknikkens stand ved at

man mellom fremgangsmåtettrinnene b) og c) gjennomfører en mellomvasking hvorved den semipolare adsorpsjonsharpiks som er ladet med blandingen av konjugerte østrogenener, vaskes med vann.

Påfyllingsforberedelsen, som inneholder i og for seg kjente fremgangsmåtettrinn a), b) og c), samt anvendelsen av det i fremgangsmåtettrinn c) erholdte eluat som inneholder en blanding av naturlig konjugerte østrogenener, er allerede generelt beskrevet i den internasjonale patentsøknad WO 98/08526, og dermed velkjent for en person med fagkunnskaper fra denne publiserte patentsøknad. Innholdet i WO 98/08526 gjøres også til gjenstand for den foreliggende søknad av åpenbaringshensyn. Ytterligere enkeltheter vedrørende generelle fremgangsmåter og anvendbare materialer er sammenfattet i eksempeldelen av den foreliggende søknad. For eksempel kan det ifølge WO 98/08526 anvendes semipolare, særlig ikke-ioniske semipolare adsorpsjonsharpikser. Dessuten er det ifølge fremgangsmåten ved den foreliggende oppfinnelse på overraskende måte også mulig å anvende andre adsorpsjonsharpikser sammen med mellomutvaskingen ifølge den foreliggende oppfinnelse uten at produktkvaliteten eller den erholdte farmasøytiske spesifikasjon forringes. De innenfor rammen av den foreliggende oppfinnelse anvendbare adsorpsjonsharpikser belyses ytterligere nedenunder i beskrivelsen.

Ifølge oppfinnelsen vaskes den semipolare adsorpsjonsharpiks som er ladet med blandingen av konjugerte østrogen i fremgangsmåte trinn a), i en mellomvasking med vann som følger etter fremgangsmåte trinn b). Mengden av vaskevann velges slik at det i det påfølgende fremgangsmåte trinn c) erholdte eluat oppviser en blanding av konjugerte østrogen som oppfyller fordringen om et høyt innhold av frie østrogen og dermed kan anvendes som aktiv komponent for farmasøytika. Som hensiktsmessig fremstår for eksempel anvendelsen av 2 til 8, fortrinnsvis 3 til 5 lagvolumer vaskevann pr. lagvolum adsorpsjonsharpiks. Herved ledes vaskevannet hensiktsmessig gjennom en reaktor som inneholder adsorpsjonsharpiksen, med en gjennomstrømningshastighet på 3 til 10, fortrinnsvis 5 til 7, volumdelar vaskevann pr. 1 volumdel adsorpsjonsharpiks pr. time.

Det må betegnes som utpreget overraskende at en forment enkel, mellom fremgangsmåte trinnene b) og c) gjennomført vasking av adsorpsjonsharpiksen med vann, også ved anvendelsen av aldret PMU fører til optimalisering av den farmasøytiske spesifisering av de som aktiv-ekstrakt utvunne blandinger av konjugerte østrogen, som fastslått ifølge oppfinnelsen. Særlig er det svært overraskende at den frem for alt i aldret PMU eventuelt innholdte forhøyede andel av frie østrogen kan forringes sikkert slik at det i fremgangsmåte trinn c) som eluat kan erholdes en blanding av naturlige konjugerte østrogen som oppfyller de høye kravene til den farmasøytiske spesifisering, for eksempel de ifølge USP eller den europeiske farmakopé stilte krav, og særlig også fra aldret PMU kan erholdes en kvalitativt og kvantitativt høyverdig ekstrakt av aktivt stoff som inneholder en naturlig konjugert østrogenblanding. Denne ekstrakten av aktivt stoff inneholder sikkert det maksimalt tolererbare maksimalinnhold av frie østrogen uavhengig av alder og opphav til den anvendte PMU, og viser seg herved som et fordelaktig og verdifullt utgangsprodukt for fremstillingen av farmasøytika. Et uønsket og optimalt skadelig tap av verdifulle farmasøytiske råstoffer, som her blandingen av naturlige konjugerte østrogen, kan således også unngås under vanskelige betingelser.

Ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen har det vist seg som en ytterligere fordel at det i fremgangsmåte trinn c) utvunne eluat oppviser forhøyet totalhormoninnhold regnet på tørrstoffet, sammenlignet med teknikkens stand. Derved fås det et tydelig forbedret kvalitetsprodukt f. eks. med hensyn til innholdet av aktivt stoff.

Ved en fordelaktig utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen gjennomføres mellomvaskingen ved temperaturer under romtemperatur, særlig ved temperaturer mellom 0 °C og 10 °C, ettersom det har vist seg at eventuelt betingede hormon- henholdsvis aktivstofftap kan reduseres betydelig gjennom den ytterligere mellomvasking. Omgivelsestemperaturen anses på vanlig måte som romtemperatur, f.eks. en temperatur som ligger mellom 20° og 30 °C. Det er særlig hensiktsmessig at

fremgangsmåten utføres ved temperaturer fra 0 °C henholdsvis ca. 0 °C. I praksis anbefales det således å arbeide ved temperaturer fra litt over 0 °C, og sørge for opprettholdelse av det nevnte temperaturområde gjennom passende tiltak. For dette kan det treffes vanlige tiltak for nedsettelse av temperaturen, f. eks. anvendelse av avkjølte reaktorer, avkjølte materialer og/eller avkjølte utgangsstoffer som PMU. Som

temperaturer fra 0 °C henholdsvis fra ca. 0 °C kan det ut fra et praktisk synspunkt vurderes temperaturområder fra 0 °C til ca. 5 °C, særlig fra 0 °C til ca. 3 °C.

For å gjøre mulig hormontap under mellomvaskingen så liten som mulig, avkjøles ifølge denne varianten av oppfinnelsen på forhånd det i mellomvaskingen og/eller også det i fremgangsmåtettrinn b) anvendte alkalisk innstilte vaskevann på temperaturer under romtemperatur, særlig på temperaturer mellom 0 °C og 10 °C. Ytterligere hensiktsmessige henholdsvis foretrukne temperaturområder er som ovenfor angitt temperaturer fra 0 °C til ca. 5 °C, særlig fra 0 °C til ca. 3 °C. Foretrukket arbeides det ved temperaturer fra 0 °C henholdsvis fra tilnærmet 0 °C, det vil si

fortrinnsvis er det i mellomvaskingen og/eller også i fremgangsmåtettrinn b) anvendte alkalisk innstilte vaskevann avkjølt på forhånd til temperaturer like over 0 °C. Gjennom anvendelsen av avkjølt, alkalisk innstilt vaskevann i fremgangsmåtettrinn b) nås en slags forhåndskjøling eller opprettholdelse av den allerede inntrådte kjøling av adsorpsjonsharpiksene, for eksempel for å unngå at det finner sted en uønsket gjenoppvarming ved tilsetningen av avkjølt vaskevann for mellomvaskingen.

Foretrukket gjennomføres således mellomvaskingen og det forutgående fremgangsmåtettrinn b) begge i det samme temperaturområde, for eksempel ved temperaturer under romtemperatur, særlig temperaturer mellom 0 °C og 10 °C, eller fortrinnsvis i de ovenfor angitte temperaturområder.

I den ovenfor nevnte variant av oppfinnelsen hvor fremgangsmåten utføres ved temperaturer under romtemperatur, kan det være ønskelig å tilsette alle anvendte innretninger som reaktorer for opptak av den semipolare adsorpsjonsharpiks eller reaktorene som nå allerede inneholder denne, og/eller den anvendte PMU forhåndskjølt til temperaturer under romtemperatur, særlig til temperaturer mellom 0 °C og 10 °C, eller til de ovenfor angitte, fortrinnsvis temperaturområder.

Som adsorpsjonsmiddel for fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er polymere adsorpsjonsharpikser egnet for anvendelse. Særlig foretrukne adsorpsjonsharpikser er semipolare, særlig ikke-ioniske semipolare, polymere adsorpsjonsharpikser. De semipolare polymere adsorpsjonsharpikser som kan anvendes som adsorpsjonsmiddel ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, er fortrinnsvis porøse organiske ikke-ioniske polymerer som i motsetning til upolare hydrofobe polymere adsorpsjonsharpikser som har en intermediær polaritet (= f. eks. med et dipolmoment for den aktive overflate til harpiksen i området fra 1,0 til 3,0, særlig 1,5 til 2,0 Debye) og har en noe mer hydrofil struktur, for eksempel polykarboksylsyreesterharpikser. Fortrinnsvis anvendes

makroporøse semipolare harpikser med fortrinnsvis makroretikulær struktur med gjennomsnittlige porediametre i området fra 50 til 150, fortrinnsvis 70 til 100 Ångstrøm, og en spesifikk overflate i området fra 300 til 900, fortrinnsvis 400 til 500 m²/g. Makroporøse kryssbundne alifatiske polykarboksylsyreesterharpikser, særlig kryssbundne polyakrylesterharpikser som f. eks. Amberlite XAD-7 fra firmaet Rohm und Haas, har vist seg som særlig egnede ikke-ioniske semipolare adsorpsjonsharpikser.

Ved siden av de nevnte foretrukne adsorpsjonsmidler kan også andre adsorpsjonsharpikser anvendes. Som adsorpsjonsharpikser egner seg således så vel upolare, semipolare og også polare adsorpsjonsharpikser. Mengden av urin som kan pumpes over adsorpsjonsmidlet, må herved bestemmes på forhånd ved hjelp av den enkelte adsorpsjonsmiddelkapasitet. Eksempler på anvendbare adsorpsjonsharpikser er handelsvanlige typer som polymere Amberlite-adsorpsjonsmidler med styrendivenylbenzengrunnskjellett (f. eks. typene XAD-1180, XAD-2, XAD-4, XAD-16), med akrylestergrunnskjellett (f.eks. XAD-7), eller slike med høypolart grunnskjellett som inneholder nitrogen og oksygen (f. eks. XAD-12). Andre adsorpsjonsharpikser er Dowex-harpikser (kopolymerer av styren og divinyllbenzen, som f. eks. Dowex 112, Dowex Optipore, Dowex Optipore V 493; Lewatite (kryssbundet polystyren), f. eks. Lewatit OC 1064, Lewatit OC 1066 eller Lewatit OC 1163, polyaminanionbytterharpikser, f. eks. Dowex-harpiks. Fordelaktige adsorpsjonsharpikser er særlig XAD-7, XAD-16 (type HP), XAD 118 og Dowex Optipore, foretrukket som Dowex Optipore V 493, samt Lewatite OC 1064, OC 1066 og OC 1163.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen byr på en rekke fordeler og forbedringer i forhold til teknikkens stand, som allerede beskrevet nærmere ovenfor. Således muliggjør oppfinnelsen anvendelsen også av aldret PMU som også kan ha en forhøyet andel av frie østrogenener uten at farmasøytiske spesifikasjoner som skal overholdes, trues. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen oppviser således også økonomiske fordeler ettersom risikoen for å tape verdifulle virkestoffer ved ikke-oppfyllelse av den farmasøytiske spesifikasjon, f.eks. ved ikke lengre tolererbare innhold av frie østrogenener, er tydelig forminsket. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen gir en kvalitetsforbedret komponent av aktivt stoff med et forhøyet hormoninnhold beregnet på tørrstoffinnholdet. Denne aktivstoffkomponenten egner seg fremragende for fremstillingen av farmasøytika som inneholder en blanding av naturlige, konjugerte østrogenener som aktivt stoff.

De etterfølgende eksempler skal belyse oppfinnelsen nærmere, imidlertid uten å begrense dens omfang.

EKSEMPLER

I de etterfølgende eksempler angis det generelle arbeidsforskrifter for utvinning av ekstrakter av aktivt stoff fra PMU, som inneholder den naturlige blanding av de konjugerte østrogener som finnes i PMU, og som i stor grad er utarmet for fenoliske urininnholdsstoffer. Det vises hvordan en kvalitetsekstrakt med høyt innhold av aktivt stoff lar seg utvinne ifølge oppfinnelsen også fra aldret PMU som kan oppvise en forhøyet andel av frie østrogener.

Fremgangsmåte ifølge WO 98/08526

For fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan det på samme måte som ifølge WO 98/08526 anvendes PMU som sådan, et derav gjennom inndamping utvunnet konsentrat eller et derav gjennom membranfiltrering utvunnet retentat. Den konsentrerte urin befris deretter på i og for seg kjent måte for slim- og faststoffer. Hensiktsmessig lar man fast- og slimstoffer avsettes og fraskiller disse så etter i og for seg kjente separeringsmetoder, for eksempel ved å dekantere, separere og/eller filtrere bort. Således kan PMU f.eks. ledes bort over en i og for seg kjent separeringsinnretning, f.eks. en separator, en filtreringsenhet eller en sedimentator. F.eks. kan et sandlag tjene som separasjonsinnretning, eller det kan anvendes handelsvanlige separasjoner, f.eks. dyse- eller kammerseparatorer. Om ønsket kan også en mikrofiltreringsenhet eller en ultrafiltreringsenhet anvendes, idet det ved deres anvendelse samtidig kan oppnås en vidtgående kim- og virusfrihet i den filtrerte PMU.

Om ønsket kan urinen tilsettes konserveringsmiddel, germicider, baktericider og/eller anthelmintika.

Såfremt det skal anvendes et konsentrert PMU-retentat i stedet for PMU, kan dette utvinnes fra PMU gjennom en i og for seg kjent membranfiltrering. Faststoffinnholdet i retentatet og dettes sammensetning kan variere alt etter den anvendte PMU og den for membranfiltreringen anvendte membran, for eksempel dennes porestørrelse, samt betingelsene for filtreringen. For eksempel kan det ved anvendelse av en nano-filtreringsmembran oppnås en tilnærmet tapsfri konsentrasjon av østrogeninnholdet i PMU-retentatet ved samtidig fjerning av inntil 50 vekt % av de lavmolekylære PMU-innholdsstoffer. For fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan det anvendes PMU-retentater som er blitt oppkonsentrert til et forhold på ca. 1:10, for eksempel et forhold på ca. 1:7, og hvor volumet således kan være inndampet til ca. 1/10, for eksempel ca. 1/7 av det opprinnelige PMU-volum.

De semipolare polymere adsorpsjonsharpikser som kan anvendes i fremgangsmåtettrinn a), er porøse organiske ikke-ioniske polymerer, som i motsetning til upolare hydrofobe polymere adsorpsjonsharpikser har en intermediær polaritet (= f.eks. med et dipolmoment for den aktive overflate til harpiksen i området fra 1,0 til 3,0, særlig 1,5 til 2,0, Debye) og en noe mer hydrofil struktur, for eksempel polykarboksylsyreester-

harpikser. Hensiktsmessig anvendes det makroporøse semipolare harpikser med fortrinnsvis makroretikulær struktur og med gjennomsnittlige porediametre i området fra 50 til 150, fortrinnsvis 70 til 100 Ångstrøm, og en spesifikk overflate i området fra 300 til 900, fortrinnsvis 400 til 500 m²/g. Makroporøse kryssbundne alifatiske

5 polykarboksylsyreesterharpikser, særlig kryssbundne polyakrylesterharpikser som f.eks. Amberlite XAD-7 fra firmaet Rohm und Haas, har vist seg som særlig egnet.

Adsorpsjonen av de konjugerte østrogenene på den semipolare adsorpsjonsharpiks kan skje ifølge WO 98/08526, og også ved fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse gjennom å bringe PMU eller dens retentat i kontakt med

10 adsorpsjonsharpiksen, idet urinvæsken innføres i en reaktor som inneholder adsorpsjonsharpiksen, og der holdes i kontakt med adsorpsjonsharpiksen i et tilstrekkelig tidsrom for adsorpsjon av østrogeninnholdet. Etter inntruffet adsorpsjon av de konjugerte østrogenene på den semipolare adsorpsjonsharpiks kan adsorpsjonsharpiksen som er ladet med blandingen av konjugerte østrogenene, skilles fra

15 den øvrige urinvæske på i og for seg kjent måte. På hensiktsmessig måte kan urinvæsken ledes gjennom en kolonne som inneholder adsorpsjonsharpiksen, med en slik gjennomstrømningshastighet at kontakttiden for adsorpsjon av østrogeninnholdet er tilstrekkelig. Det er for eksempel egnet med en gjennomstrømningshastighet som tilsvarer en gjennomstrømning på 3 til 10, fortrinnsvis 5 til 7 volumdeler PMU/1

20 volumdel adsorpsjonsharpiks/time. Hensiktsmessig kan gjennomstrømningshastigheten til urinvæsken gjennom reaktoren styres ved et lavt overtrykk eller undertrykk. Mengden av semipolar adsorpsjonsharpiks som skal anvendes kan variere alt etter typen til den anvendte adsorpsjonsharpiks og mengden av faststoffinnholdet i urinvæsken. Ved anvendelse av PMU kan det for eksempel fylles på en volumandel

25 adsorpsjonsharpiks, f.eks. kryssbundet alifatisk polykarboksylsyreester-adsorpsjonsharpiks, med inntil 80 volumdeler forbehandlet PMU, uten at merkbare mengder østrogen er påvisbar i urinvæsken som renner ut. Ved anvendelse av et PMU-konsentrat eller PMU-retentat reduseres naturligvis påfyllingskapasiteten til adsorpsjonsharpiksen med en mengde som denne er blitt oppkonsentrert til. Således

30 kan for eksempel 1 volumdel kryssbundet alifatisk polykarboksylsyreester-adsorpsjonsharpiks påfylles en mengde urinvæske som tilsvarer 20-80, fortrinnsvis 30-50 volumdeler PMU.

Den semipolare adsorpsjonsharpiks som er påfylt blandingen av konjugerte østrogenene, vaskes i fremgangsmåtetrinn b) med et vaskevann som er innstilt på et pH-

35 område på minst 12,0, særlig på 12,5-14, fortrinnsvis ca. 12,5-13,5. Som vaskevann kan det anvendes vandige oppløsninger av inerte basiske stoffer som er oppløselige i urinvæsken, og som er sterke nok til å nå en pH-verdi på minst 12,5. Som vannoppløselige basiske stoffer som er inerte overfor den semipolare polymere adsorpsjonsharpiks, er det fortrinnsvis egnet med vannoppløselige uorganiske baser

som alkalimetall- eller jordalkalimetallhydroksider, særlig natriumhydroksid.

Vaskevannet inneholder hensiktsmessig bare ca. slike mengder av basiske stoffer som er nødvendig for å oppnå den ønskede pH-verdi, fortrinnsvis ca. pH 13. Mengden av vaskevann velges slik at det langt på vei er tilstrekkelig til å fjerne fenoliske

urininnholdsstoffer uten at det derved utvaskes nevneverdige mengder konjugerte østrogener. Anvendelse av for eksempel 2 til 10, særlig 4 til 6 lagvolumer vaskevæske pr. lagvolum adsorpsjonsharpiks har vist seg hensiktsmessig. På en hensiktsmessig måte ledes herved vaskevannet gjennom en reaktor som inneholder adsorpsjonsharpiksen, med en gjennomstrømningshastighet på 3 til 10, fortrinnsvis 5 til 7 volumdeler vaskevann/1 volumdel adsorpsjonsharpiks/time.

I fremgangsmåtetritt c) behandles deretter den vaskede adsorpsjonsharpiks som er ladet med blandingen av konjugerte østrogener, med en tilstrekkelig mengde av en elueringsvæske til eluering av blandingen av de konjugerte østrogener, og det utvinnes et eluat som inneholder den naturlige blanding av de konjugerte østrogener fra PMU. Elueringsvæsken som anvendes ifølge oppfinnelsen, utgjøres av et med vann blandbart organisk oppløsningsmiddel fra gruppen med vannblandbare etere, lavere alkanoler og lavere alifatiske ketoner, eller en blanding av et slikt med vann blandbart oppløsningsmiddel og eventuelt alkalisk innstilt vann. Som eterbestanddeler i elueringsvæsken egner seg sykliske etere som tetrahydrofuran eller dioksan som er blandbare med vann, men også åpenkjedede etere som er blandbare med vann, for eksempel etylenglykoldimetyleter (= monoglyme), dietylenglykoldimetyleter (= diglyme) eller etyloksyetyloksyetanol (= karbitol). Som lavere alkanoler er det egnet med alkylalkoholer med 1-4, fortrinnsvis 1-3 karbonatomer, særlig etanol eller isopropanol som er blandbare med vann. Som lavere alifatiske ketoner er det egnet med ketoner med 3-5 karbonatomer, særlig aceton, som er blandbare med vann. Som særlig gunstig har elueringsvæsker med det organiske oppløsningsmiddel etanol vist seg å være. Hensiktsmessig anvendes det som elueringsvæsker blandinger av ett av de ovenfor nevnte organiske oppløsningsmidler som er blandbare med vann, og eventuelt alkalisk innstilt vann. pH-verdien til et slikt vannholdig elueringsmiddel ligger i det nøytrale til det alkaliske område, inntil pH 13, og kan fordelaktig utgjøre ca. 10-12. Som oppløsningsmiddelkomponenter i den vannholdige elueringsvæske velges det et stabilt oppløsningsmiddel i det anvendte pH-område. I vannholdige alkaliske elueringsvæsker med pH-verdier på ca. 10 til 12 er det som oppløsningsmiddelkomponent regnet med lavere alkanoler, fortrinnsvis etanol. Den ønskede pH-verdi i det vannholdige elueringsmiddel innstilles gjennom tilsetning av en tilsvarende mengde av et vannoppløselig inert basisk stoff, fortrinnsvis en uorganisk base, for eksempel et alkalimetall- eller jordalkalimetallhydroksid, særlig natriumhydroksid. I vannholdige elueringsvæsker kan det foreligge et volumforhold mellom organisk oppløsningsmiddel

som er blandbart med vann, og vann i området fra 40:60 til 20:80, fortrinnsvis ca. 30:70. Den anvendte mengde av elueringsmiddel kan utgjøre ca. 3 til 10, særlig ca. 4 til 6 lagvolumer pr. lagvolum adsorpsjonsharpiks. Det er hensiktsmessig at elueringsvæsken ledes gjennom en reaktor som inneholder adsorpsjonsharpiksen ladet med østrogenblandingen, med en slik gjennomstrømningshastighet at kontakttiden for fullstendig eluering av blandingen av konjugerte østrogener blir tilstrekkelig. Ved anvendelse av en blanding av etanol og vann i volumforholdet 30:70 er det for eksempel egnet med gjennomstrømningshastigheter på 3-10, fortrinnsvis 5-7 volumdeler elueringsvæske pr. 1 volumdel adsorpsjonsharpiks pr. time. Elueringen gjennomføres hensiktsmessig i et temperaturområde fra romtemperatur til ca. 60 °C, fortrinnsvis ved ca. 40-50 °C. Det er ønskelig at gjennomstrømningshastigheten reguleres ved å arbeide ved svakt forhøyet trykk, f.eks. ved et overtrykk på inntil 0,2 bar, og at eluatet fanges opp i flere fraksjoner. Innholdet i de enkelte eluatfraksjoner av konjugerte østrogener og fenoliske urininnholdsstoffer som kresoler og HPMF, kan bestemmes på i og for seg kjent måte gjennom væskechromatografi med høy yteevne (= high performance liquid chromatography, forkortet som HPLC).

Ved elueringen fås først en svakt farget til fargeløs, praktisk talt østrogenfri første gjennomstrømningsfraksjon, hvis mengde vanligvis tilsvarer ca. ett lagvolum. Hovedmengden av de konjugerte østrogener, for eksempel mellom 80 og 99 % av de konjugerte østrogener som finnes i utgangs-PMU, befinner seg i de påfølgende mørkegulbrunt fargede hovedeluatfraksjoner som generelt omfatter en mengde på 2 til 4 lagvolumer. I de påfølgende etterløpsfraksjoner finnes generelt bare spor av konjugerte østrogener. Såfremt det fås etterfølgefraksjoner som inneholder et ytterligere innhold av konjugerte østrogener over 10 vekt % beregnet på tørrstoff, og minst som 0,6 vekt % beregnet på tørrstoff av kresoler og HPMF, kan disse slås sammen med det østrogenrike hovedeluat for videre opparbeidelse.

EKSEMPEL 1 (sammenligningseksempel):

a) Adsorpsjon av østrogeninnholdet i PMU på en semipolar polyakrylesteradsorpsjonsharpiks

En kolonne med 220 mm høyde og en diameter på 40 mm ble påfylt 300 ml av en i vann svellet, semipolar polyakrylesteradsorpsjonsharpiks (= Amberlite XAD-7 fra firmaet Rohm und Haas, kornstørrelse 0,3 til 1,2 mm, dipolmoment 1,8 Debye, gjennomsnittlig porediameter 80 Ångstrøm, spesifikk overflate ca. 450 m²/g tørr). 10,5 l (= 35 lagvolumer) av en PMU som er filtrert gjennom en ultrafiltreringsenhet (innhold av østronsulfatsalt og kresol bestemt ved hjelp av HPLC, se etterfølgende eksempeltabell) ledes gjennom kolonnen ved romtemperatur med en gjennomstrømningshastighet på gjennomsnittlig 24 ml/min (= 4,8 lagvolumer pr. time). Østrogeninnholdet i PMU adsorberes fullstendig på den således ladde semipolare

adsorpsjonskolonne. Urinvæsken som renner ut, undersøkes ved hjelp av HPLC med hensyn på dens innhold av konjugerte østrogener (beregnet som østronsulfatsalt) og viser seg å være praktisk talt østrogenfri. Utløpsvæsken kastes.

5 b) Vasking av den ladde adsorpsjonsharpikskolonnen

Den ladde adsorpsjonsharpikskolonnen vaskes med 1,5 l av en vandig natriumhydroksidoppløsning med en pH-verdi på 13. For dette ledes det alkaliske vaskevann med en gjennomstrømningshastighet på gjennomsnittlig 24,6 ml/min (= 4,9 lagvolumer pr. time) gjennom kolonnen. Vaskevæsken som renner ut undersøkes med hensyn på
10 sitt innhold av østronsulfatsalt ved hjelp av HPLC. Undersøkelsen viser at mindre enn 5 % av alt østrogen som tilføres kolonnen, vaskes ut under vaskefasen.

15 c) Desorpsjon av de konjugerte østrogener fra den vaskede adsorpsjonsharpikskolonnen

1,5 l av elueringsvæsken (etanol/vann = 30:70) ledes gjennom kolonnen som er forvarmet til den i eksempeltabellen angitte elueringstemperatur, med en strømningshastighet på 25 ml/min (= 5,0 lagvolumer pr. time). Utløpseluatet fanges opp i 5 fraksjoner. Fraksjonene utgjør hver 300 ml (= 1 lagvolum) og undersøkes ved hjelp av HPLC med hensyn på deres innhold av østronsulfatsalt.

20 Den første fraksjonen inneholder bare spor av østrogensulfatsalt. Eluatet kommer til syne fargeløst til blekgul-farget. I de etterfølgende fraksjoner 2-4 er så ca. 80 til 98 % av den totale mengde konjugerte østrogener som er adsorbert på kolonnen, inneholdt. Eluatet har her en sterk mørkebrun fargetone. Den siste fraksjonen inneholder bare en liten mengde østrogensulfatsalt, noe som også er tydelig på fallet i
25 fargestyrke.

For fraksjonene som inneholder hovedmengden av de konjugerte østrogener, er i de etterfølgende tabeller TS-innholdet i vekt % og innholdet av østronsulfatsalt og kresol bestemt gjennom HPLC, angitt. Disse fraksjonene utgjør en ekstrakt som er egnet for en galenisk viderebearbeidelse.

30 d) Regenerering av adsorpsjonsharpikskolonnen

For regenerering vaskes kolonnen først med 600 ml av en blanding av etanol og vann som inneholder 50 % etanol, og som er innstilt på pH 12, så med 600 ml av en blanding av etanol og vann som inneholder 70 % etanol, og som er innstilt på pH 12,
35 deretter med 600 ml 10 %-ig vandig natriumcitratoppløsning og til sist med 600 ml destillert vann. Hele regenereringen skjer ved en temperatur på 45 °C. Kolonnen kan lades flere ganger, for eksempel inntil 40 ganger, og regenereres på nytt.

EKSEMPEL 2 (fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen):

Eksempel 1 ble gjentatt med mellomvaskingen ifølge oppfinnelsen mellom fremgangsmåtetrinnene b) og c).

Mellomvasking

5 Den ladede adsorpsjonsharpijskolonne vaskes med 900 ml vann. Herved ledes det nøytrale vaskevann med en gjennomsnittlig gjennomstrømningshastighet på 25,0 ml/min (= 5,0 lagvolumer pr. time) gjennom kolonnen.

Utløpsvaskevæsken undersøkes ved hjelp av HPLC med hensyn på dens innhold av østronsulfatsalt og kresol. Undersøkelsen viser at bare en liten del
10 (maksimalt bare ca. noen prosent) av alle østrogenet tilført kolonnen vaskes ut under denne vaskefasen. Ifølge oppfinnelsen reduseres også andelen av frie østrogenet ved gjennomføring av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen (se eksempel 4).

Tabell I: Resultater fra sammenligningseksempel 1 og eksempel 2 ifølge oppfinnelsen

Eksempel nr.	1	2
Fremgangsmåtettrinn a):		
Start-PMU		
Østron mg/l	86,4	92,3
Equilin mg/l	57,0	57,0
Kresol mg/l	1191,1	877,6
Fremgangsmåtettrinn b):		
Vaskevann = vandig NaOH-oppløsning	pH 13	pH 13
Mellomvasking:		
Vaskevann = vann		
Vaskefraksjon 1: mg/l		0,0
Østron mg/l	Sammenligning: Mellomvasking ikke gjennomført	20,9
Equilin mg/l		18,0
Kresol		
Vaskefraksjon 2: mg/l		125,0
Østron mg/l		0,0
Equilin mg/l		0,0
Kresol		
Vaskefraksjon 3: mg/l		290,6
Østron mg/l		138,0
Equilin mg/l		31,5
Kresol		

Fremgangsmåtettrinn c):		
Elueringsvæske	Etanol/vann 30:70	Etanol/vann 30:70
Elueringstemperatur	45 °C	45 °C
Eluatfraksjon 1: vekt % TS	4,3	0,2
Østron mg/l (vekt % TS)	0,0 (0,00)	342,7 (17,14)
Equilin mg/l (vekt % TS)	24,8 (0,06)	182,6 (9,13)
Eluatfraksjon 2: vekt % TS	1,9	0,9

Østron	mg/l (vekt % TS)	2788,6 (14,68)	2053,5 (22,81)
Equilin	mg/l (vekt % TS)	1528,0 (8,04)	1120,1 (12,45)
Eluatfraksjon 3:			
	vekt % TS	0,2	0,2
Østron	mg/l (vekt % TS)	193,2 (9,66)	38,9 (1,95)
Equilin	mg/l (vekt % TS)	99,8 (4,99)	19,8 (0,99)
Eluatfraksjon 4:			
	vekt % TS	0,1	0,1
Østron	mg/l (vekt % TS)	7,1 (0,71)	0,0 (0,00)
Equilin	mg/l (vekt % TS)	9,3 (0,93)	0,0 (0,00)

EKSEMPEL 3 (fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen med avkjøling):

Reduksjon av hormontapet under den nøytrale vasking

Det ble arbeidet som i eksemplene 1 og 2, men under avkjøling. Avkjølingen tjener til å minimalisere hormontapet under mellomvaskingen. Dersom mellomvaskingen gjennomføres ved romtemperatur med isvann, så kan hormontapet senkes med inntil ca.

50 %, særlig når temperaturen under fremgangsmåten er 0 °C eller tilnærmet 0 °C. Det anbefales her ikke bare å tilsette isvann, som kan varmes opp forholdsvis hurtig på grunn av kolonneinnholdet som foreligger ved romtemperatur, men det er snarere hele kolonnen som skal avkjøles til 0 °C.

Forsøksgjennomføring

Den kolonnetemperaturen på 0 °C som er nødvendig for mellomvaskingen, oppnås gjennom en avkjøling under den forutgående basiske vasking, dvs. at allerede den basiske vaskingen forløp ved 0 °C. Spesifikasjonen på 5 lagvolumer med 0 °C ved den basiske vaskingen var således tilstrekkelig til å avkjøle kolonneinnholdet fra romtemperatur til 0 °C. Den påfølgende mellomvaskingen kunne så forløpe ved 0 °C. Ved siden av minimaliseringen av hormontapet ble også den mulige temperaturpåvirkningen på kresolfraskillelsen under den basiske vaskingen undersøkt.

For direkte sammenligning ble det gjennomført to forsøk:

EKSEMPEL 3a: Basisk vasking og mellomvasking ved romtemperatur.

EKSEMPEL 3b: Basisk vasking og mellomvasking ved 0 °C.

Alle andre trinn fulgte fremgangsmåtene som angitt ovenfor for den i WO 98/08526 beskrevne fremgangsmåte, eller som angitt i eksemplene 1 og 2.

Forsøksresultater:

Tabell III gjengir forsøksparametrene og forsøksresultatene ved romtemperatur og med temperering til 0 °C.

Forsøksresultatene tilkjenner tydelig at:

- a) Den basiske vaskingen, dvs. kresolfjerningen, ikke påvirkes av temperatur-reduksjon til 0 °C. Separasjonen av kresol forløper kvantitativt. Tabell III gir et overblikk.
- b) Hormontapet under mellomvaskingen reduseres med ca. 50 % gjennom temperatursenkingen. Tabell II gir et overblikk.

Tabell II Hormontap og deres minimalisering gjennom mellomvaskinger ved 0 °C

Eksempel nr.	3a	3b
	Romtemperatur (T = ca. 25 °C)	Isvann (T = ca. 0 °C)
Østron	2,7 vekt %	1,8 vekt %
Equilin	3,4 vekt %	1,4 vekt %

Spesifikasjonen med ca. 0 °C temperert natronlut under den basiske vaskingen tilbyr dermed en enkel mulighet for likeledes å senke hormontapet ved mellomvaskingen gjennom å arbeide ved ca. 0 °C uten påvirkning av kresolfraskillelsen.

Nedsettelsen av temperaturen under mellomvaskingen til ca. 0 °C umuliggjør en minimalisering, dvs. forminskning av det gjennom den ytterligere mellomvasking uunngåelige hormontap til ca. 50 %.

Kolonnetempereringen under mellomvaskingen kan oppnås på enkel måte når den basiske vasking som gjennomføres før mellomvaskingen, likeens forløper ved 0 °C. Den kresolfraskillelse som finner sted under den basiske vaskingen, påvirkes ikke negativt gjennom temperaturnedsettelsen.

Tabell III

Gjennomføring av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen ved romtemperatur og under avkjøling

Eksempel nr.	3a	3b
Fremgangsmåtetritt a):		
	Romtemperatur (T = ca. 25 °C)	Isvann (T = ca. 0 °C)
Start-PMU		
Østron mg/l	64,9	65,4
Equilin mg/l	57,9	57,6
Kresol mg/l	329,0	333,0
Fremgangsmåtetritt b):		
Vaskevann = vandig NaOH-oppløsning	pH 13	pH 13
Vaskefraksjon 1:		
Østron mg/l	4,4	1,7
Equilin mg/l	0,0	1,6
Kresol mg/l	55,1	51,6
Vaskefraksjon 2:		
Østron mg/l	28,8	27,9
Equilin mg/l	31,5	24,8
Kresol mg/l	6942,5	7011,0
Vaskefraksjon 3:		
Østron mg/l	0,0	0,0
Equilin mg/l	11,5	18,3
Kresol mg/l	2215,2	2774,0
Vaskefraksjon 4:		
Østron mg/l	0,0	0,6
Equilin mg/l	0,0	3,2
Kresol mg/l	280,6	268,6
Vaskefraksjon 5:		
Østron mg/l	0,0	0,0
Equilin mg/l	0,0	0,0
Kresol mg/l	76,6	44,1
Hormontap i vaskefraksjon 1 - 5		
Østron	1,5 %	1,3 %
Equilin	2,1 %	2,4 %
Mellomvasking:		

Vaskevann = vann			
Vaskefraksjon 1:	mg/l	0,0	0,0
Østron	mg/l	0,0	0,0
Equilin	mg/l	22,8	19,4
Kresol			
Vaskefraksjon 2:	mg/l	13,3	8,2
Østron	mg/l	9,7	5,9
Equilin	mg/l	33,2	11,8
Kresol			
Vaskefraksjon 3:	mg/l	48,0	32,0
Østron	mg/l	58,3	23,3
Equilin	mg/l	76,0	0,0
Kresol			
Hormontap i vaskefraksjon 1 - 3			
Østron		2,7 %	1,8 %
Equilin		3,4 %	1,4 %

Fremgangsmåtettrinn c):			
Elueringsvæske		Etanol/vann 30:70	Etanol/vann 30:70
Elueringstemperatur		45 °C	45 °C
Eluatfraksjon 1:			
vekt % TS		0,2	0,2
Østron mg/l (vekt % TS)		76,0 (3,80)	58,0 (2,90)
Equilin mg/l (vekt % TS)		65,8 (3,29)	48,2 (2,41)
Eluatfraksjon 2:			
vekt % TS		1,0	0,9
Østron mg/l (vekt % TS)		1237,0 (12,37)	1145,6 (12,73)
Equilin mg/l (vekt % TS)		1093,8 (10,94)	1135,0 (12,61)
Eluatfraksjon 3:			
vekt % TS		0,4	0,5
Østron mg/l (vekt % TS)		607,8 (15,20)	840,0 (16,80)
		524,7 (13,12)	748,4 (14,97)

TS)			
Equilin mg/l	(Vekt %	0,1	0,1
TS)		84,6 (8,46)	144,6 (14,46)
		58,2 (5,82)	107,4 (10,74)
Eluatfraksjon 4:		0,0 (0,00)	0,0 (0,00)
	vekt % TS		
Østron mg/l	(vekt %	0,1	0,1
TS)			
Equilin mg/l	(vekt % TS)	21,1 (2,11)	34,3 (3,43)
Kresol mg/l	(vekt % TS)	7,5 (0,75)	17,9 (1,79)
Eluatfraksjon 5:			
	vekt % TS	9,0	15,2
Østron mg/l	(vekt %	0,0	3,4
TS)			
Equilin mg/l	(vekt % TS)		
Eluatfraksjon 6:			
Østron mg/l	(vekt %		
TS)			
Equilin mg/l	(vekt % TS)		

EKSEMPEL 4 (reduksjon av innholdet av frie hormoner):

- Ifølge fremgangsmåten i eksemplene 1 til 3 ovenfor ble det undersøkt om innholdet av frie hormoner nedsettes ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Resultatet er vist i de etterfølgende tabeller IV a (Sammenligningsforsøk uten mellomvasking) og IV b (Forsøk ifølge oppfinnelsen med mellomvasking).

Tabell IV Minimalisering av de frie hormoner:

10 **Tabell IV a** Sammenligningsforsøk uten mellomvasking

	Innhold av frie østrogener i konsentrat	Totalinnhold av konjugerte østrogener beregnet på tørrstoffinnholdet i konsentratet
	(vekt %)	(vekt %)
Forsøk 1	3,21	3,2
Forsøk 2	3,67	4,4

Forsøk 3	2,38	9,2
Forsøk 4	4,14	12,2
Forsøk 5	4,03	9,9

Tabell IV b Forsøk med mellomvasking (ifølge oppfinnelsen)

	Innhold av frie østrogener i konsentrat	Totalinnhold av konjugerte østrogener beregnet på tørrstoffinnholdet i konsentratet
	(vekt %)	(vekt %)
Forsøk 6	0,0	25,2
Forsøk 7	0,77	17,2
Forsøk 8	0,35	23,9
Forsøk 9	0,20	29,3
Forsøk 10	0,0	27,7

P a t e n t k r a v

5 1. Fremgangsmåte for utvinning av en naturlig blanding av konjugerte østrogener som er utarmet på fenoliske urininnholdsstoffer, fra urinen til drektige hopper, hvorved man:

a) bringer en urinvæske som eventuelt utgjøres av en urinvæske som er befridd for slim- og faststoffer, et inndampet konsentrat av denne urinvæsken eller et
10 inndampet urinretentat som er erholdt gjennom membranfiltrering av denne urinvæsken, i kontakt med en polymer adsorpsjonsharpiks i en tilstrekkelig mengde til adsorpsjon av den i urinvæsken inneholdte blanding av konjugerte østrogener, og fraskiller en polymer adsorpsjonsharpiks som er ladet med blandingen av konjugerte østrogener, fra den øvrige urinvæske,

15 b) vasker den polymere adsorpsjonsharpiks som er ladet med blandingen av konjugerte østrogener med et vaskevann som er innstilt på et pH-område på minst 12,0, og

c) bringer den vaskede adsorpsjonsharpiks i kontakt med en elueringsvæske i en tilstrekkelig mengde til desorpsjon av den der adsorberte blanding av konjugerte
20 østrogener, som utgjøres av et med vann blandbart organisk oppløsningsmiddel fra gruppen med vannblandbare etere, lavere alkanoler og lavere alifatiskes ketoner, eller en blanding av det med vann blandbare organiske oppløsningsmiddel og eventuelt alkalisk innstilt vann, og skiller eluatet med den naturlige blanding av konjugerte østrogener fra adsorpsjonsharpiksen, og
25 eventuelt inndamper,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det gjennomføres en mellomvasking mellom fremgangsmåtetrinnene b) og c), hvorved den polymere adsorpsjonsharpiks som er ladet med blandingen av konjugerte østrogener, vaskes med vann.

30 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at mellomvaskingen gjennomføres ved temperaturer under romtemperatur, særlig ved temperaturer mellom 0 °C og 10 °C, fortrinnsvis ved temperaturer like over 0 °C.

35 3. Fremgangsmåte ifølge ett av de forutgående krav,
k a r a k t e r i s e r t v e d at vaskevannet som anvendes til mellomvaskingen, er avkjølt på forhånd til temperaturer under romtemperatur, særlig temperaturer mellom 0 °C og 10 °C, fortrinnsvis til temperaturer like over 0 °C.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at det i fremgangsmåtetritt b) anvendte, alkalisk innstilte
vaskevann på forhånd er avkjølt til temperaturer under romtemperatur, særlig til
temperaturer mellom 0 °C og 10 °C, fortrinnsvis til temperaturer like over 0 °C.

5

5. Fremgangsmåte ifølge ett av de forutgående krav,
karakterisert ved at mellomvaskingen og det forutgående
fremgangsmåtetritt b) gjennomføres ved temperaturer under romtemperatur, særlig
ved temperaturer mellom 0 °C og 10 °C, fortrinnsvis ved temperaturer like over 0 °C.

10

6. Fremgangsmåte ifølge ett av de forutgående krav,
karakterisert ved at de anvendte apparater, som reaktorer for opptak av den
polymere adsorpsjonsharpiks eller reaktorer som allerede inneholder denne, og/eller det
anvendte PMU anvendes tilsvarende på forhånd avkjølt til temperaturer under
romtemperatur, særlig til temperaturer mellom 0 °C og 10 °C, fortrinnsvis til
temperaturer like over 0 °C.

15

7. Fremgangsmåte ifølge ett av de forutgående krav,
karakterisert ved at det som polymer adsorpsjonsharpiks anvendes semipolar
adsorpsjonsharpiks, fortrinnsvis ikke-ionisk semipolar adsorpsjonsharpiks.

20