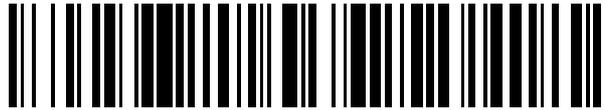


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 704**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 36/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2012 PCT/JP2012/006758**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14064731**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2012 E 12887015 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2828276**

54 Título: **Extracto rico en rutina de Uncaria elíptica y método de preparación**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2018

73 Titular/es:
ALPS PHARMACEUTICALS, IND. CO., LTD.
(100.0%)
10-50, Mukaimachi 2-chome, Furukawa-cho, Hida-
shi
Gifu 509-4241, JP

72 Inventor/es:
MINAMI, KAZUNOBU;
TANIWAKI, SHINJI y
KATSUMATA, AKIKO

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 693 704 T3

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

DESCRIPCIÓN

Extracto rico en rutina de Uncaria elliptica y método de preparación

Campo técnico de la invención

Esta invención se refiere a un extracto rico en rutina y a un método para preparar el extracto rico en rutina.

5 Antecedentes de la invención

La rutina es un flavonoide natural utilizado como material de partida de la troxerutina, que aumenta la resistencia de los capilares y reduce la permeabilidad de las paredes de los vasos sanguíneos venosos. Un estudio clínico mostró que el tratamiento de pacientes con un derivado de la rutina, venoruton, condujo a una mejoría del síndrome posttrombótico. Véase, Panminerva Medicine, 53, página 13, 2011. Otro estudio encontró que la rutina es uno de los agentes antitrombosis más eficaces. Véase, The Journal of Clinical Investigation, 122, N° 6, 2012. La rutina como un material de partida para agentes farmacéuticos es cada vez más importante.

Para extraer y purificar la rutina de varias fuentes de plantas, por ejemplo, Sophora Japonica (Asia), Fava d'anta (Brasil) y Uncaria elliptica (Brasil), se utilizan típicamente disolventes de agua y metanol. Sin embargo, en la práctica, los extractos ricos en rutina derivados de dichas fuentes vegetales tienen desventajas significativas, tales como ser de un color marrón denso y contener un mayor contenido de hierro en comparación con extractos ricos en rutina de otras fuentes. Este color marrón se atribuye a los pigmentos de la planta.

Compendio de la invención

Es muy difícil eliminar este color marrón y reducir el contenido de hierro mediante métodos convencionales de extracción y/o purificación, ya que el hierro parece estar fuertemente incorporado en los pigmentos. Se han hecho intentos de superar estas desventajas. Sin embargo, estos intentos no lograron reducir el hierro incorporado en los pigmentos y al mismo tiempo mantener un buen rendimiento de rutina.

Existe la necesidad de un procedimiento económico, adecuado para aplicaciones a gran escala que pueda producir extractos ricos en rutina con un alto contenido de rutina, bajo contenido de hierro y una reducción de la pigmentación.

Esta invención se basa en el descubrimiento inesperado de que se pueden usar combinaciones específicas de alcoholes y ácidos para obtener extractos ricos en rutina de plantas que tienen contenido de hierro y pigmentación bajos.

Por consiguiente, se describe en este documento un método para obtener un extracto rico en rutina a partir de plantas. El método incluye disolver un extracto vegetal que contiene rutina en metanol o etanol para obtener una solución de extracto de rutina en bruto, el extracto vegetal sólido que contiene rutina contiene de 90% a 95% de rutina en peso y de 100 a 300 ppm de hierro; reducir el volumen de la solución de extracto de rutina en bruto para obtener un concentrado; obtener una mezcla añadiendo al concentrado un ácido de 1-15% en peso del extracto vegetal que contiene rutina, y opcionalmente un alcohol C1-C4, agua, o ambos, en donde el extracto vegetal que contiene rutina constituye de 8% a 30% (p/v) de la mezcla y el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido gálico y ácido málico; dejar reposar la mezcla para la formación de un precipitado; y aislar el precipitado, obteniendo así un extracto rico en rutina que contiene menos de 20 ppm de hierro.

El extracto de la planta que contiene rutina se puede obtener como un precipitado en bruto de la extracción de Uncaria elliptica, Sophora Japonica o Fava d'anta con agua, un alcohol o un alcohol acuoso.

En algunas formas de realización, el ácido se agrega a de 1-10%, por ejemplo, 1-5%, o 2-4% en peso del extracto vegetal que contiene rutina. En los casos en que se agregan agua y alcohol C1-C4, la relación de agua al alcohol C1-C4 puede ser de 1:1 a 5:1, por ejemplo, de 1:1 a 3:1. El agua y el alcohol C1-C4 se pueden agregar por separado, al mismo tiempo, o en forma de un alcohol acuoso C1-C4.

También se incluye en este documento un extracto rico en rutina de Uncaria elliptica, extracto que contiene de 97% a 99% de rutina medido por HPLC y menos de 20 ppm de hierro, la absorción del extracto a 550 nm es inferior a 0,2. El extracto también puede contener de 5% a 10% de agua en peso. Se puede preparar por el método descrito anteriormente.

Descripción de la invención

Los detalles de uno o más aspectos se exponen en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones. La invención se define en las reivindicaciones.

En este documento se describe un método para obtener extractos ricos en rutina de fuentes vegetales utilizando nuevas combinaciones de alcoholes y ácidos. Los extractos ricos en rutina obtenidos por el método tienen una pigmentación y contenido de hierro significativamente reducidos en comparación con los extractos preparados por métodos convencionales.

Usando métodos convencionales conocidos en la técnica, se puede preparar un extracto sólido que contiene rutina a partir de varias fuentes de plantas, por ejemplo, Sophora Japonica (Asia), Fava d'anta (Brasil) y Uncaria elliptica (Brasil). Tales métodos incluyen, pero no se limitan a remojar, calentar, agitar, remover o hacer una infusión de material vegetal, por ejemplo, tallos y hojas, en varios disolventes. El material vegetal utilizado puede estar en forma de planta completamente seca, planta triturada o polvo. Los disolventes incluyen agua, alcoholes (por ejemplo, metanol) o alcoholes acuosos. Después de la extracción, la solución de extracto se puede separar del sólido mediante tamizado, filtrado, prensado u otras técnicas adecuadas. El filtrado se puede concentrar y enfriar para permitir que se forme un precipitado, obteniéndose así un extracto sólido que contiene rutina. Para las descripciones de varios métodos de extracción, véase, por ejemplo, el documento de patente china 1013579; el documento de patente de Estados Unidos US2006/0099690; y Dighe et al., International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2(1): 750-757 (2011).

Típicamente, los extractos sólidos que contienen rutina preparados por estos métodos tienen un alto contenido de hierro, por ejemplo, de 100-300 ppm, y están muy pigmentados, por ejemplo, amarillos o marrones, particularmente en extractos que se originan de Uncaria elliptica. La rutina puede consistir en de 85% a 90% en peso de estos extractos sólidos que contienen rutina.

Un extracto sólido que contiene rutina así preparado puede disolverse en un disolvente alcohólico, preferiblemente metanol o etanol, para obtener una solución de extracto de rutina en bruto. Por ejemplo, se pueden disolver de 0,05 - 0,13 g del extracto sólido por 1 ml de disolvente. La solución de extracto en bruto puede concentrarse adicionalmente, por ejemplo, a presión atmosférica, para reducir su volumen, por ejemplo, de 4 a 10 veces. El volumen final de la solución de extracto en bruto se puede predeterminar según el volumen y los contenidos deseados de la mezcla que se describe a continuación.

Un ácido, y opcionalmente un alcohol C1-C4, por ejemplo, metanol, etanol, propanol o n-butanol, se agregan a la solución de extracto en bruto de rutina descrita anteriormente para obtener una mezcla. El agua también se puede incluir en la mezcla.

El ácido utilizado se selecciona entre el ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido gálico y ácido málico. Se agrega a la solución de extracto en bruto de rutina a aproximadamente de 1-15%, por ejemplo, de 1 - 10%, o de 1 - 5% en peso del extracto sólido que contiene rutina descrito anteriormente utilizado para preparar la solución de extracto de rutina en bruto.

La mezcla debe contener al menos un alcohol C1-C4. Por ejemplo, como se describe anteriormente, metanol o etanol (es decir, un alcohol C1-C4) se puede usar para hacer la solución de extracto en bruto de rutina a partir del extracto sólido que contiene rutina. Puede que no sea necesario agregar alcohol C1-C4 adicional a la solución de extracto en bruto de rutina. En algunos casos, a fin de obtener una mezcla que contenga de 8% a 30% (p/v) de extracto sólido que contenga rutina, se puede agregar un alcohol C1-C4, un alcohol acuoso C1-C4 o un alcohol C1-C4 y agua, por ejemplo, a de 2-12 veces (v/p) del extracto sólido que contiene rutina. El alcohol C1-C4 adicional agregado puede ser igual o diferente del alcohol utilizado para elaborar la solución de extracto en bruto de rutina.

La rutina existe como diversos hidratos, tales como monohidrato, dihidrato y trihidrato. Se sabe que el anhidrato y el monohidrato son inestables. Por lo tanto, es preferible preparar un dihidrato o trihidrato relativamente estables por hidratación por medio de agua durante el proceso de purificación. Por consiguiente, se puede añadir agua a la solución de extracto en bruto de rutina. Se puede añadir por separado. También se puede añadir en forma de un alcohol acuoso C1-C4. La relación de agua al alcohol C1-C4 puede ser de 1:1 a 5:1, por ejemplo, de 1:1 a 3:1. Como se indicó anteriormente, la mezcla final contiene preferiblemente de 8% a 30% (p/v) de extracto sólido que contiene rutina.

La mezcla que contiene la solución de extracto en bruto de rutina, el alcohol C1-C4, el ácido y el agua opcional se deja entonces reposar para que se forme un precipitado, es decir, cristalice. Por ejemplo, la mezcla se puede concentrar más y la mezcla concentrada se agita y se deja enfriar para que se forme el precipitado. El precipitado se puede recoger mediante cualquier técnica adecuada, por ejemplo, filtración, lavado con un alcohol y/o agua, y secado.

El precipitado, es decir, un extracto rico en rutina, puede contener de 97% a 99% de rutina según lo medido por HPLC, y menos de 20 ppm de hierro, por ejemplo, menos de 10 ppm. También tiene una pigmentación baja, por ejemplo, la absorción del extracto a 550 nm es inferior a 0,2. También puede incluir de 5% a 10% de agua en peso. El extracto rico en rutina puede tener cualquier tamaño de partícula, por ejemplo, 5 µm (micrómetro) o menos. Por ejemplo, puede tener partículas de tamaño nanométrico.

El extracto rico en rutina preparado por el método descrito anteriormente es útil para varias aplicaciones. Puede formularse como una composición farmacéutica, por ejemplo, un fármaco. También se puede utilizar como suplemento nutricional o aditivo alimentario.

Ejemplos

Los ejemplos específicos a continuación deben interpretarse como meramente ilustrativos y no limitativos del resto de la divulgación de ninguna manera. Sin más elaboración, se cree que un experto en la técnica puede, en base a la descripción en este documento, utilizar la presente invención en su máxima extensión.

ES 2 693 704 T3

Los valores de contenido de hierro, pureza y absorbancia descritos en los Ejemplos 1-4 a continuación se obtuvieron mediante los siguientes procedimientos:

(1) Contenido de hierro

- 5 Se obtuvo con precisión 1,0 g de muestra y se sometió a la acción del ácido sulfúrico (se vitriolizó). Se añadieron 2 ml de ácido clorhídrico al residuo. La muestra se secó luego, y se calentó en agua hirviendo después de la adición de 10 ml de agua con una gota de ácido clorhídrico. Después de enfriar, el volumen se ajustó con precisión a 10,0 ml y luego se filtró a través de un filtro de 0,45 micras. La concentración de hierro en la solución de la muestra se determinó mediante análisis ICP (plasma acoplado por inducción).

(2) Absorción visible

- 10 Se disolvió 1,0 g de muestra en 15 ml de dimetilformamida (DMF). Después de ajustar el volumen a 20,0 ml con DMF, la solución se filtró a través de un filtro de 0,45 micrones. La absorción de la muestra filtrada se midió a 550 nm con una longitud de trayectoria de 1,0 cm.

(3) Análisis por HPLC

- 15 El análisis de HPLC se realizó según la monografía EP de rutósido trihidrato, sustancias relacionadas por cromatografía líquida. Brevemente, los reactivos y condiciones utilizados se exponen a continuación:

[Quim. 1]

Solución de ensayo: se disuelven 0,10 g de la sustancia a examinar en 20 ml de metanol y se diluye hasta 100,0 ml con la fase móvil B.

Solución de referencia (a): Se disuelven 10,0 mg de rutósido trihidrato CRS en 10,0 ml de metanol.

- 20 Solución de referencia (b): Se diluye 1,0 ml de la solución de referencia (a) hasta 50,0 ml con la fase móvil B.

Columna (LiChrospher 100 RP-8, C8, 4,0 x 250 mm, Agilent):

- tamaño: l = 0,25 m, d. i. 4,0 mm,
- fase estacionaria: gel de sílice de octilsililo para cromatografía (5 µm)
- temperatura: 30° C.

- 25 Fase móvil:

- fase móvil A: mezclar 5 volúmenes de tetrahidrofurano con 95 volúmenes de una solución de 15,6 g/l de fosfato diácido de sodio ajustado a pH 3,0 con ácido fosfórico.

- fase móvil B: mezclar 40 volúmenes de tetrahidrofurano con 60 volúmenes de una solución de 15,6 g/l de fosfato diácido de sodio ajustado a pH 3,0 con ácido fosfórico.

- 30 [Quim. 2]

Tiempos de gradiente

Tiempo (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0 - 10	50 - 0	50 - 100
10 - 20	0	100
20 - 21	0 - 50	100 - 50
21 - 25	50	50

Caudal: 1 ml/min.

Detección: espectrofotómetro a 280 nm.

- 35 Inyección: 20 µl.

- 40 Los ácidos y alcoholes utilizados en los Ejemplos 1-4 a continuación se obtuvieron de Wako Pure Chemical Industries, Ltd (Osaka): el ácido ascórbico (mínimo 99,5% de primer grado); ácido cítrico (mínimo 98,0% de grado especial); ácido málico (mínimo 99,0% de grado especial); ácido gálico (98,0-103,0% de primer grado); ácido tartárico (mínimo 99,0% de primer grado); metanol (mínimo 99,5% de primer grado); etanol (mínimo 99,5% de grado especial); n-propanol (mínimo 99,7% de grado especial); n-butanol (mínimo 99,0% de grado especial).

Ejemplo 1: Preparación de una solución de extracto de rutina en bruto

Los tallos y hojas de *Uncaria elliptica* se extrajeron con agua y/o alcohol mediante procedimientos convencionales para obtener extractos sólidos que contenían rutina. Se disolvieron tres series de extracto sólido que contenía rutina (50 g cada uno) en 600 ml de metanol y se agitaron durante dos horas a 30-35 grados C (Celsius). Cada solución se filtró y se concentró a la presión atmosférica para producir 300 ml de solución de extracto de rutina en bruto. Los extractos sólidos que contenían rutina, así preparados, contenían un 85-90% (p/p) de rutina y 100-200 ppm de hierro. Desarrollaron un color marrón oscuro cuando se disolvieron en disolventes orgánicos y la absorbancia promedio en DMF a 550 nm fue de 0,8-1,3. Los datos se resumen en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Nº de lote	Hierro (ppm)	Absorción (550nm)	Contenido de rutina (%), p/p	Contenido de agua (%)
A	167	1,173	88,0	9,6
B	174	1,149	89,2	9,2
C	160	1,048	88,6	8,9

10 Ejemplo 2: Influencia del ácido ascórbico en combinación con varios disolventes

(1) Metanol

Tres series de solución de extracto de rutina en bruto, cada una obtenida de la disolución de 50 g de extracto sólido que contenía rutina en 600 ml de metanol (MeOH), se concentraron a presión atmosférica para dar 300 ml de volumen. Cada uno de los concentrados recibió 0, 1,0 o 5,0 g de ácido ascórbico y cada uno se concentró adicionalmente para dar un volumen de 150 ml. Después de permitir la cristalización por enfriamiento, los cristales de rutina purificada se recogieron por filtración seguido de lavado con metanol. La rutina purificada se secó a 60 grados C (Celsius) durante 5 horas y se analizó como se describió anteriormente. Los resultados se resumen en la Tabla 2 a continuación. La adición de ácido ascórbico durante el procedimiento de cristalización redujo el hierro residual y disminuyó la absorción a 550 nm de una manera dependiente de la dosis.

20 Tabla 2

Nº	Extracción	Cristalización	Ácido	Cantidad (%)*	Hierro (ppm)	Absorción (550 nm)	Rutina HPLC Área (%)	Rendimiento (%)	Contenido de Agua (%)
1	MeOH	MeOH	ninguno	-	22,4	0,235	99,0	70,2	4,9
2	MeOH	MeOH	Ácido ascórbico	2	13,7	0,146	98,9	69,9	4,7
3	MeOH	MeOH	ácido Ascórbico	10	10,2	0,114	98,4	70,5	5,5

* Cantidad de aditivo en con relación al peso del extracto sólido que contiene rutina

(2) Etanol

Dos series de 500 ml de solución de extracto de rutina en bruto, obtenidas de la disolución de 25 g de extracto sólido que contenía rutina en etanol (EtOH), fueron cada una concentrada bajo presión atmosférica para dar 100 ml de volumen. Cada concentrado recibió 25 ml de agua que contenía 0 o 0,5 g de ácido ascórbico. Después de permitir la cristalización agitando y enfriando, se recogió por filtración los cristales de rutina purificada, seguido por lavado con 15 ml de etanol al 95%. La rutina purificada se secó a 60 grados C (Celsius) durante 5 horas y se analizó como se describió anteriormente. Los resultados se resumen en la Tabla 3 a continuación. Los efectos del ácido ascórbico no fueron tan significativos como en el caso en que se usó metanol en el proceso de cristalización (véase anteriormente).

30 Tabla 3

Nº	Extracción	Cristalización	Ácido	Cantidad (%)*	Hierro (ppm)	Absorción (550 nm)	Rutina HPLC Área (%)	Rendimiento (%)	Contenido de Agua (%)
4	EtOH	Agua/EtOH	ninguno	-	10,7	0,280	97,1	84,0	9,2
5	EtOH	Agua/EtOH	Ácido ascórbico	2	9,59	0,260	97,0	83,5	8,7

* Cantidad de aditivo en relación con el peso del extracto sólido que contiene rutina

(3) Propanol

Se prepararon dos series de soluciones de extracto de rutina en bruto disolviendo 25 g de extracto sólido que contenía rutina en 300 ml de MeOH. Cada extracto se concentró a presión atmosférica para dar 43 ml de volumen. Cada

- 5 concentrado recibió propanol acuoso (n-propanol:agua 1:1; total 200 ml) que contenía 0 o 0,5 g de ácido ascórbico. Después de permitir la cristalización agitando y enfriando, se recogió por filtración los cristales de rutina purificada. Los cristales de rutina se lavaron con 25 ml de n-propanol seguido de agua. La rutina purificada se secó a 80 grados C (Celsius) durante 6 horas y se analizó. Los resultados analíticos se resumen en la Tabla 4 a continuación. El ácido ascórbico redujo el hierro residual y disminuyó la absorción a 550 nm de la rutina purificada.

Tabla 4

Nº	Extracción	Cristalización	Ácido	Cantidad (%)	Hierro (ppm)	Absorción (550 nm)	Rutina HPLC área (%)	Rendimiento (%)	Contenido de agua (%)
6	MeOH	Agua/propanol	ninguno	-	26,7	0,296	98,2	76,4	8,1
7	MeOH	Agua/propanol	Ácido ascórbico	2	12,8	0,148	98,2	74,8	8,1

* Cantidad de aditivo en relación con el peso del extracto sólido que contiene rutina

(4) Butanol

- 10 Se prepararon cuatro soluciones de extracto de rutina en bruto disolviendo 25 g de extracto sólido que contenía rutina en 300 ml de MeOH. Cada solución de extracto se concentró a presión atmosférica para dar 43 ml de volumen. Cada uno de los concentrados recibió n-butanol acuoso (agua:n-butanol=133:67 ml) que contenía 0, 0,25, 0,5 o 2,5 g de ácido ascórbico. Después se permitió la cristalización mediante agitación y enfriamiento, los cristales de rutina purificados se recogieron por filtración y luego se lavaron con 25 ml de n-butanol seguido de 100 ml de agua. La rutina purificada se secó a 80 grados C (Celsius) durante 6 horas y se analizó como se describió anteriormente. Los resultados analíticos se resumen en la Tabla 5. El ácido ascórbico redujo el hierro residual y disminuyó la absorción a 550 nm de la rutina purificada.
- 15

Tabla 5

Nº	Extracción	Cristalización	Ácido	Cantidad (%)*	Hierro (ppm)	Absorción (550 nm)	Rutina HPLC Área (%)	Rendimiento (%)	Contenido de Agua (%)
15	MeOH	Agua/BuOH	ninguno	-	60,3	0,701	97,6	83,6	8,4
16	MeOH	Agua/BuOH	Ácido ascórbico	1	15,5	0,245	98,2	83,5	8,0
17	MeOH	Agua/BuOH	Ácido ascórbico	2	1,86	0,097	98,2	82,4	7,9
18	MeOH	Agua/BuOH	Ácido ascórbico	10	1,36	0,074	98,1	82,9	8,0

* Cantidad de aditivo en relación con el peso del extracto sólido que contiene rutina

- 20 Ejemplo 3: Influencia de varios ácidos en combinación con butanol acuoso

- Se prepararon siete soluciones de extracto de rutina en bruto disolviendo 25 g de extracto sólido que contenía rutina, obtenido como se describe en el Ejemplo 1, en 300 ml de MeOH. Los extractos se concentraron a presión atmosférica para dar 43 ml de volumen cada uno. Cada concentrado recibió butanol acuoso (agua:n-butanol=133:67 ml) que contenía ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico o ácido gálico en la cantidad que se muestra en la Tabla 6 a continuación. Después de permitir la cristalización de los concentrados mediante agitación y enfriamiento, se recogió los cristales de rutina purificada por filtración. La rutina purificada se lavó con 25 ml de n-butanol seguido de 100 ml de agua. La rutina purificada se secó a 80 grados C (Celsius) durante 6 horas y se analizó como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Excepto por el ácido gálico, todos los demás ácidos redujeron el hierro residual y disminuyeron la absorción a 550 nm de la rutina purificada.
- 25
- 30 Los resultados descritos en los Ejemplos 2 y 3 indican que una combinación de butanol y ácido ascórbico es la más efectiva para reducir tanto el contenido de hierro como el color amarillo que muestra la absorción a 550 nm.

Tabla 6

Nº	Extracción	Cristalización	Ácido	Cantidad (%)*	Hierro (ppm)	Absorción (550 nm)	Rutina HPLC Área (%)	Rendimiento (%)	Contenido de Agua (%)
----	------------	----------------	-------	---------------	--------------	--------------------	----------------------	-----------------	-----------------------

ES 2 693 704 T3

8	MeOH	Agua/BuOH	ninguno	-	60,3	0,701	97,6	83,4	8,4
9	MeOH	Agua/BuOH	Ácido tartárico	2	15,2	0,224	98,0	83,5	8,3
10	MeOH	Agua/BuOH	Ácido cítrico	2	27,6	0,313	98,1	80,8	8,0
11	MeOH	Agua/BuOH	Ácido málico	2	27,9	0,353	98,2	82,8	8,0
12	MeOH	Agua/BuOH	Ácido gálico	2	60,6	0,809	98,0	82,9	8,0
13	MeOH	Agua/BuOH	Ácido tartárico Ácido tartárico	10	10,8	0,101	97,4	81,2	7,2
14	MeOH	Agua/BuOH	Ácido cítrico Ácido gálico	3% cada uno	18,6	0,146	97,3	81,0	7,3

* Cantidad de aditivo en relación con el peso del extracto sólido que contiene rutina

Ejemplo 4: Influencia de los disolventes

La rutina purificada se obtuvo usando varios disolventes sin ningún ácido. Se observó que el butanol acuoso y el etanol acuoso dieron un mejor rendimiento de rutina en comparación con otros disolventes. Véase la Tabla 7 a continuación.

5 Tabla 7

Nº	Extracción	Cristalización	Ácido	Cantidad (%)*	Hierro (ppm)	Absorción (550 nm)	Rutina HPLC Área (%)	Rendimiento (%)	Contenido de agua (%)
1	MeOH	MeOH	Ninguno	-	22,4	0,235	99,0	70,2	4,9
4	EtOH	Agua/EtOH	Ninguno	-	10,7	0,280	97,1	84,0	9,2
6	MeOH	Agua/propanol	Ninguno	-	26,7	0,296	98,2	76,4	8,1
15	MeOH	Agua/BuOH	Ninguno	-	60,3	0,701	97,6	83,6	8,4

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener un extracto rico en rutina de una planta, el método comprende disolver un extracto de una planta que contiene rutina en metanol o etanol para obtener una solución de extracto de rutina en bruto, el extracto de la planta que contiene rutina contiene de 90% a 95% de rutina en peso y de 100 a 300 ppm de hierro;
- 5 reducir el volumen de la solución de extracto de rutina en bruto para obtener un concentrado;
- obtener una mezcla agregando al concentrado un ácido de 1-15% en peso del extracto vegetal que contiene rutina, un alcohol C1-C4 y agua, en donde el extracto vegetal que contiene rutina constituye de 8% a 30% (p/v) de la mezcla y el ácido es el ácido ascórbico;
- dejar reposar la mezcla para la formación de un precipitado; y
- 10 aislar el precipitado, obteniendo así un extracto rico en rutina que contiene menos de 20 ppm de hierro.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el extracto de planta que contiene rutina se obtiene como un precipitado en bruto de extraer *Uncaria elliptica*, *Sophora Japonica* o *Fava d'anta* con agua, un alcohol o un alcohol acuoso.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en donde el ácido se añade al 1-10% en peso del extracto de planta que contiene rutina, preferiblemente 1 a 5% en peso del extracto de planta que contiene rutina, aún más preferiblemente al 2-4% del extracto de planta que contiene rutina.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el alcohol C1-C4 y el agua se agregan en forma de un alcohol acuoso C1-C4 que contiene 5-80% de agua en volumen.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en donde la proporción de agua con respecto al alcohol C1-C4 es de 1:1 a 5:1 en volumen o 1:1 a 3:1 en volumen.
6. El método de la reivindicación 1, en donde el alcohol C1-C4 es el metanol y el ácido es el ácido ascórbico.
7. El método de la reivindicación 1, en donde el alcohol C1-C4 es el n-butanol o propanol.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el alcohol C1-C4 es el n-butanol.
- 25 9. El método de la reivindicación 8, en donde el ácido se agrega al 1-10% en peso del extracto vegetal que contiene rutina, preferiblemente al 1-5% en peso del extracto vegetal que contiene rutina, aun más preferiblemente a 2-4% en peso del extracto vegetal que contiene rutina.
10. El método de la reivindicación 8, en donde la proporción de agua con respecto al alcohol C1-C4 es de 1:1 a 5:1 en volumen o 1:1 a 3:1 en volumen.
- 30 11. Un extracto rico en rutina de *Uncaria elliptica* que puede obtenerse según el método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el extracto comprende de 97% a 99% de rutina como se mide por HPLC y menos de 20 ppm de hierro, la absorción del extracto a 550 nm es menos de 0,2, en donde la absorción se mide según el método siguiente: 1,0 g de muestra se disuelve en 15 ml de dimetilformamida, después el volumen se ajusta a 20,0 ml con dimetilformamida, la solución se filtra a través de un filtro de 0,45 micras y la absorción de la muestra filtrada se mide a 550 nm con una longitud de trayectoria de 1,0 cm.
- 35 12. El extracto rico en rutina de la reivindicación 11, en donde el extracto contiene al menos 98% de rutina como se mide por HPLC y menos de 10 ppm de hierro, y la absorción a 550 nm es menos de 0,1.
13. El extracto rico en rutina de la reivindicación 12, en donde el extracto contiene de 5% a 10% de agua en peso.