

337959



MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

formulada el 13 de Marzo de 1.967, con el número 337.959

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de CHEMISCH - PHARMAZEUTISCHE FABRIK ADOLF KLINGE
& CO., entidad alemana, establecida en Leopoldstr. 16,
Munich, República Federal Alemana, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA SAPONINA DE
CASTAÑA SILVESTRE SOLUBLE EN AGUA"

El invento se refiere a un procedimiento para
la preparación de una escina (alfa-escina) soluble en
agua, a partir de partes del árbol de castaña silvestre,
especialmente semillas de castaña silvestre, la cual en
5 comparación con la parte de escina (beta-escina) difícil-
mente soluble en agua de un extracto de castaña silvestre,
muestra solo aproximadamente la mitad de la acción hemolí-
tica.

Hay que indicar que, según las investigacio-
nes efectuadas hasta ahora, ni la beta-escina ni la alfa-

10
31.5.67.



20

-escina parecen ser materiales definidos; según los conocimientos actuales se trata de mezclas de glicósidos con propiedades físico-químicas similares (por ejemplo comportamiento de reparto en mezclas de disolventes de dos fases o sobre adsorbentes).

5

Se ha encontrado ahora que bajo determinadas condiciones se logra una transformación de la escina difícilmente soluble en agua (la forma ácida de la beta-escina es difícilmente soluble en agua), en la escina fácilmente soluble en agua (la forma ácida de la alfa-escina es fácilmente soluble en agua), sin que se verifique en este caso ninguna saponificación considerable a productos más pobres en acilo, la cual se verifica, según es conocido, de manera comparativamente fácil en las saponinas de castaña silvestre en medio alcalino por saponificación, con separación de sus grupos acilo, para obtener el escinol difícilmente soluble, hemolíticamente inactivo.

10

15

20

Según el invento, a partir de un extracto de castaña silvestre, por transformación de la denominada beta-escina, que en el extracto de reciente está en gran exceso sobre la parte de alfa-escina, se prepara una gran parte de la alfa-escina valiosa con un IH de aproximadamente 1:15.000 a 1:22.000, por ejemplo 1:18.000.

25

El invento se basa en el conocimiento de que la beta-escina puede ser transformada en alfa-escina y se puede evitar una separación de los grupos acilo o una saponificación a escinol - al menos en lo esencial - , disminuyendo la acidez de un extracto acuoso-alcohólico o de una solución de beta-escina y regulando o ajustando la reacción de la solución por adición de sustancias tampón

30

13.4.67.



que reaccionan de manera aproximadamente neutra, o de forma más sencilla, de medios alcalinos, por ejemplo lejía de sodio, a un valor de pH de 5,0-7,5, en cualquier caso superior a 4,5, preferiblemente por encima de 6,0 y por debajo de 7,0, de manera que el invento propone ajustar una solución que contiene beta-escina a un valor de pH en el margen de más de 4,5 y menos de 7,5, preferiblemente en el margen de 5-7, especialmente por encima de 6 y por debajo de 7, y dejar reposar dicha solución.

Se comprobó que, en un medio aproximadamente neutro, la beta-escina se presenta en forma de un anión, el cual al almacenar a la temperatura ambiente y más rápidamente a temperatura más elevada, preferiblemente en el margen de 50-100°C, se transforma en alfa-escina, es decir en un producto, el cual une un bajo IH con una alta actividad farmacológica, sin que resulten en este caso mayores cantidades de productos de saponificación hemolíticamente inactivos.

Es conocido, que la beta-escina puede ser transformada, por trituración durante 50 horas en un mortero, en un producto amorfo frente a los rayos X, que en concentraciones hasta de 2%, permanece disuelto en agua durante algunas horas. También se describe la incorporación de 1-3 radicales acetilo, que conducen a una elevación de la solubilidad. Finalmente, es conocida la obtención de alfa-escina a partir de la parte de saponina de extractos de castaña silvestre susceptible de ser precipitada con colessterina.

Mientras que, por una parte, la obtención de alfa-escina pasando por la colessterida de saponina es re-

13.4.67.



lativamente molesta, y por otra parte, la escina triturada hasta tamaño de micras produce solo soluciones inestables de pequeña concentración, una acetilación conduce ya a una escina parcialmente modificada sintéticamente.

5 Por el contrario, según el invento, se logra, de manera sencilla, preparar, a partir de la escina difícilmente soluble en agua, un producto fácilmente soluble en agua, que permanece estable en solución en agua durante años, pudiéndose esterilizar en calor soluciones acuosas al 1-10% de alfa-escina, sin conducir a una disminu-
10 ción de la actividad hemolítica.

 Soluciones de alfa-escina acuosas de alto porcentaje (al 10-20%) tienden después de almacenamientos más largos a la formación de compuestos de asociación que se
15 hacen perceptibles por la formación de gelatinas. Un corto calentamiento hasta 50-60°C hace desaparecer de nuevo este fenómeno, sin que aparezcan precipitaciones.

 A causa de estas propiedades físico-químicas favorables, las soluciones de alfa-escina son tan apropiadas tanto como preparado para inyección, como para una
20 utilización oral.

 Se ha comprobado, que la parte de escina (alfa-escina) de por sí conocida - identificada por los inventores - que permanece en solución, cuando la escina insoluble en agua (beta-escina) es precipitada por acidificación
25 de la solución de extracto - tal como es igualmente conocido - , posee un índice hemolítico (IH) relativamente pequeño, dentro del orden de magnitud de aproximadamente 1:20.000, mientras que, sin embargo, muestra sorprendente
30 mente una considerable acción antiedematosa, que se puede

30
13.4.67.



medir en el edema inflamatorio.

La actividad hemolítica de las saponinas de castaña silvestre es determinada preferiblemente según los métodos fotométricos descritos en lo que sigue, que proporcionan valores exactos y óptimos.

Se mide la extinción del colorante de la sangre que se ha disuelto, estabilizado en forma de cianohemoglobina.

Se compara la concentración de la saponina de ensayo con la de la saponina normalizada (beta-escina, IH = 1:40.000), que causa la disolución de la mitad de una suspensión al 2% de eritrocitos (obtenida mezclando 1 ml de suspensión de eritrocitos de carnero al 4% con 1 ml de solución de saponina) a un pH 7,2, después de un reposo de 24 horas a la temperatura ambiente.

Hasta ahora se conducía de otra manera la obtención de la beta-escina considerada especialmente activa, y se pensaba que lo que de saponinas de castaña silvestre, permanece en el extracto, después de precipitar y separar la beta-escina, o estaba enteramente exento de valor (a causa del pequeño IH) o tenía poco valor y podía ser desechado, ya que eran los vestigios de beta-escina no abarcados o incluidos en la precipitación. El invento enseña ahora un camino opuesto, es decir que se debe obtener la mayor cantidad posible de alfa-escina, mucho más de la que está presente en el extracto reciente de castañas frescas.

Según una forma de realización preferida del invento se parte de un extracto de castaña silvestre, especialmente de un extracto de castaña silvestre reciente-

30
13.4.67.



mente preparado de semillas de castaña silvestre recién
tamente cosechadas; subsiguientemente a la extracción se
transforma, según esta forma de realización del invento,
al extracto en beta-escina, de manera de por sí conocida
5 por ejemplo por adición de ácido fuerte o utilizando un
cambiador de cationes, precipitándose la beta-escina en
su forma ácida.

Esta beta-escina es convertida o transformada
entonces a la forma de su sal, preferiblemente sal alcali
10 na, por ejemplo sal de sodio, por ejemplo por adición de
lejía de sodio acuosa, hasta que se alcanza un valor de
pH en el margen de 4,5 a 7,5, especialmente 6,4 a 6,9. Es
ta solución es dejada a la temperatura ambiente o, prefe-
riblemente, es calentada con lo que por insignificante se
15 paración de radicales acilo, el pH puede disminuir hasta
aproximadamente 6, en ausencia de sustancias tampón, y la
beta-escina se transforma parcialmente o completamente,
en un producto soluble en agua, dependiendo del tiempo,
temperatura y concentración.

20 Según otra forma preferida de realización del
invento, después de una parcial transformación de la be-
ta-escina, se realiza una separación de la parte soluble
en agua por acidificación, preferiblemente hasta un pH de
1,5 - 2,0, precipitando la forma ácida libre, difícilmen-
25 te soluble en agua, del resto de la beta-escina, se sepa-
ra de la solución y puede ser transformada de nuevo en
una solución neutra, la cual es transformada entonces de
nuevo por reposo, preferiblemente bajo suave calentamien-
to, en saponina soluble en agua. Esta transformación in-
30 completa de beta-escina en saponina soluble en agua hace

13.4.67.

20 ABR 1967

posible la obtención óptima de material farmacológicamente activo.

5 Si, después de tener lugar la transformación en la saponina soluble en agua, se sobrepasa mucho el plazo de conservación en el medio de reacción, aparece, dependiendo del pH, la temperatura y la concentración, la separación ya observada anteriormente de los grupos acilo, que conduce a productos hemolíticamente inactivos con pequeña solubilidad.

10 Se prefiere - tal como se indica anteriormente - la transformación de toda la beta-escina en alfa-escina, es decir la obtención de la saponina de castaña silvestre del extracto, en su totalidad en forma de alfa-escina.

15 Por encima de la influencia del tiempo, la temperatura y la concentración es especialmente importante el valor de pH de la solución, en la que se realiza la transformación de beta-escina en alfa-escina, inhibiendo la transformación valores de pH por debajo de 4,5, mientras que valores de pH por encima de 7,5 conducen a una rápida separación.

20 También es importante, para la velocidad de la transformación y también para la magnitud o grado de la transformación, la temperatura a la que es mantenida la solución. Aquí se dieron acciones favorables a temperaturas en el margen desde la temperatura ambiente hasta 100°C, preferiblemente de 50-90°C.

25 En lugar de precipitar la beta-escina, a partir de la solución de extracto, por acidificación o paso a través de un cambiador de cationes, y separar de esta
30
13.4.67.



manera la beta-escina del extracto, es decir de la alfa-escina y de los restantes componentes del extracto, se puede proceder también, según otra forma de realización preferida, dejando el extracto de castaña silvestre recientemente preparado en la proximidad del punto neutro a la temperatura ambiente o de manera más corta, a temperatura elevada, teniendo lugar la transformación por ejemplo cuantitativa en alfa-escina de la parte presente en el extracto inicialmente en forma de beta-escina. En lo que se refiere al tiempo, la temperatura, la concentración y los valores de pH, sirven también para esta forma de realización las reglas antes indicadas.

La siguiente tabla muestra la transformación de beta-escina en alfa-escina a un pH de 6,9, dependiendo del tiempo, la temperatura y la concentración. Como sustancia de ensayo se escogió una beta-escina (punto de fusión 223-224°C), muy purificada por múltiple reprecipitación, que fue convertida en la sal soluble en agua en suspensión acuosa al 15%, después de mezclar con lejía de sodio hasta un pH 6,9. Después de la correspondiente transformación, se hizo pasar la solución a través de una columna cambiadora de cationes y la solución ácida saliente fue calentada durante 7 minutos hasta 96°C, para precipitar la beta-escina todavía presente. La alfa-escina que se encontraba en solución fue secada en vacío y determinada gravimétricamente. La actividad hemolítica de la parte soluble en agua había disminuído en todas las cargas aproximadamente hasta la mitad, con relación a la escina difícilmente soluble en agua.

13.4.67.

T A B L A

Parte porcentual de alfa-escina después de transposición de la beta-escina a pH 6,9

Temperatura: 90º										
β -Na ^m	2h	3,5 h	5 h	6,5 h	9 h	10 h	14 h	18 h		
1%	49	74	84	87	100					
10%		43	55	64		74	85	100		
Temperatura: 68º										
β -Na ^m	24 h	48 h	72 h	96 h	Temperatura: 50º					
1 %	47	80	92		1 %	26				
10 %	19	40	48	77	10 %	8				

(m) Concentración de beta-escina-sodio en solución acuosa a pH 6,9.



1 9 1

64 64 64 64 64 64



Ejemplo 1

10 g de beta-escina son suspendidos en 50 ml de agua, son llevados cuidadosamente a pH 6,9 con NaOH N/10 y la solución transparente es diluída con agua hasta 100 ml. La solución al 10% de escinato de sodio es calentada durante la noche (14 horas) hasta 90°C, después de enfriar es mezclada con 100 ml de agua, y es hecha pasar a través de una columna cambiadora de cationes (aproximadamente 50 ml de cambiador). La solución ácida saliente es calentada durante 7 minutos hasta aproximadamente 90°C y el precipitado de beta-escina, que se forma, es separado por centrifugación. La solución ligeramente turbia es clarificada a través de un filtro prensa, y el filtrado es secado bajo vacío en el evaporador de rotación.

15 Rendimiento: 85% de saponina soluble en agua (alfa-escina) con una actividad hemolítica de aproximadamente 1:20.000.

Ejemplo 2

20 Un extracto recientemente obtenido a la temperatura ambiente, a partir de castañas secas, con etanol o metanol aproximadamente al 60%, es liberado de alcohol, es ajustado hasta un residuo de material seco de 10% y es mezclado cuidadosamente con NaOH hasta un pH 6,7. Después de calentar durante 2 horas hasta 96°C, ya no se puede precipitar más escina, por acidificación hasta pH 2 y un calentamiento hasta 96°C durante 10 minutos adicionales, en contraposición con el extracto no calentado. La actividad hemolítica del extracto calentado ha disminuído aproximadamente en una cuarta parte.



N O T A

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

5 1.- Un procedimiento para la preparación de una saponina de castaña silvestre soluble en agua, con actividad hemolítica relativamente más pequeña, caracterizado, porque la beta-escina difícilmente soluble en agua en su forma de ácido libre es transformada, dejándola reposar en solución acuosa en el margen de pH de 4,5 a 7,5, a 10 temperatura relativamente más baja, por ejemplo la temperatura ambiente, y preferiblemente a temperatura elevada, en la forma de escina con bajo índice de hemólisis (IH) en el margen de 15.000-22.000, por ejemplo 18.000.

15 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado, porque a partir del extracto de castaña silvestre, preferiblemente un extracto de reciente preparación a partir de semillas frescas, se precipita la beta-escina de manera de por sí conocida, por ejemplo por acidificación o por paso a través de un cambiador de cationes, es separada de los restantes materiales componentes del extracto y es transformada en forma de sal disuelta con compuestos de reacción alcalina, especialmente lejía de sodio, y es tratada para ser transformada en alfa-escina. 20

25
13.4.67.

557939



3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el extracto de castaña silvestre, preferiblemente una solución de extracto de reciente preparación, es neutralizado sin reposo más largo, y la beta-escina de la solución de extracto es transformada en alfa-escina.

4.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1, 2 ó 3, caracterizado porque después de la transformación en alfa-escina, un resto de beta-escina, después de acidificar o pasar a través de un cambiador de cationes, es precipitado por calentamiento y es separado.

5.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 4, caracterizado, porque la transformación se realiza en un margen de pH de 4,5 a 7,5, preferiblemente un pH de 6,0 a 6,9.

6.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4 ó 5, caracterizado porque la transformación más favorable se realiza en un margen de temperaturas desde la temperatura ambiente o menos, por ejemplo entre 10°C y 100°C, preferiblemente de 60-90°C.

7.- Un procedimiento para la preparación de una saponina de castaña silvestre soluble en agua.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.



Esta Memoria consta de trece hojas escritas a
máquina por una sola cara.

Madrid, 20 ABR. 1967

P. A.

Muerto de Elizabeth
Ex. P. A.

G.D.S.
13.4.67.

- 13 -

337959