



196204

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

196204

por "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ESTER MONOFOSFORICO DE LA LACTOFLAVINA", a favor de la firma suiza, F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A., de Basilea (Suiza).

- . -

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a una nueva preparaci3n de un 3ster de 3cido monofosf3rico de la riboflavina, fisiol3gicamente activo. Este 3ster, particularmente en la forma de sus sales, por ejemplo, su sal s3dico, tiene la muy deseable propiedad de ser mucho m3s soluble que la riboflavina misma, siendo, por consiguiente, de gran utilidad para la preparaci3n de soluciones de riboflavina apropiadas para la inyecci3n o su incorporaci3n en alimentos. Diferente de 3steres de 3cidos org3nicos, nuestro 3ster de 3cido monofosf3rico ofrece, asimismo, la gran ventaja de ser intensamente resistente a la hidr3lisis en un extenso alcance de pH. Nuestro invento comprende tambi3n nuevos productos intermedios para producir dicho 3ster.

5. R. Kuhn y sus colaboradores (Ber.69, 1543, 1974 (1936)  
10. Pat. estadounidense 2.111.491) dieron parte de la preparaci3n  
15.

196204

20 E



- de un éster de ácido fosfórico de la riboflavina, pero no in  
dicaron el punto de fusión o rotación óptica de su producto.  
P. Karrer y sus colaboradores (Helv.Chim.Acta 20, 79 (1937),  
al intentar repetir la labor de Kuhn y otros, establecieron
5. lo siguiente "Hemos llevado a cabo docenas de experimentos,  
pero hasta ahora no logramos obtener ácido fosfórico de lac  
toflavina (riboflavina) sintético puro. Al contrario, la com  
posición de las preparaciones siempre ha sido variable y no  
concordó con la de una simple sal cálcica de ácido fosfórico
10. de lactoflavina. Se puede suponer que los citados autores .  
(Kuhn y otros) encontrarán similares dificultades, ya que no  
publican cifras analíticas respecto de su preparación (mien  
tras que las publican con respecto a sus productos intermedia  
rios, libres de fósforo)".
15. El procedimiento descrito en la patente de Kuhn, arri  
ba mencionada, se representa en dicha patente para implicar  
una reacción entre riboflavina y oxiclورو de fósforo. La re  
acción alegada es establecida para tener lugar en presencia  
de una base orgánica y, más particularmente, en la presencia
20. de piridina. El empleo de oxihaluro fosfórico, como descrito  
en esa patente, no obstante, no ha resultado coronado por el  
éxito, como se aprecia de las observaciones de P. Karner y  
de sus colaboradores antes citados. Nosotros hemos repetido  
el procedimiento de Kuhn, empleando el oxihaluro fosfórico es
25. pecífico mencionado en la patente, o sea, el oxiclورو fosfó  
rico, en presencia de piridina, no habiendo estado en condi-  
ciones de establecer la síntesis del deseado éster de ácido  
monofosfórico de riboflavina a base de dicho procedimiento.  
Como se describirá más adelante, nuestro procedimiento impli
30. ca una distinta divergencia del procedimiento de Kuhn, en tan

196204

20

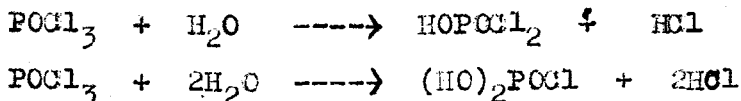


to que nosotros no empleamos ningún oxihaluro fosfórico, sino que, al contrario, usamos ácidos clorofosfóricos.

5. Nuestro procedimiento nuevo para fosforilar la riboflavina, en distinción por calidades opuestas respecto del de Kuhn y otros, no ofrece dificultades y produce un éster de ácido monofosfórico de la riboflavina, fácilmente aislable en buen rendimiento.

10. Nuestro nuevo método para fosforilar la riboflavina consiste en tratar previamente oxiclورو fosfórico (POCl<sub>3</sub>) con agua, para formar un ácido clorofosfórico, en el cual resulta soluble la riboflavina, y por lo cual es fácilmente fosforilada a temperatura ambiente. Por otra parte, la riboflavina resulta prácticamente insoluble en oxiclورو de fósforo, no siendo fosforilada por el mismo en ninguna extensión apreciable a temperatura interior, mientras que después del calentamiento se presenta la descomposición. Otra ventaja de nuestro invento es que no se requiere ninguna base, como la piridina, para catalizar la fosforilación, tal como se usa por Kuhn y otros, ni hace falta mantener las condiciones rigurosamente anhidras, usualmente necesarias con una mezcla fosforilante de POCl<sub>3</sub>-piridina.

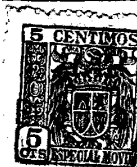
15. De preferencia empleamos alrededor de 1 a 2 moles de agua por mol de POCl<sub>3</sub>, debido a la mayor rapidez de la acción fosforilante. El tratamiento de oxiclورو fosfórico con agua sigue el curso:



30. Si se adicionan unos volúmenes de éster anhidro a la solución obtenida después de la reacción de riboflavina con el POCl<sub>3</sub> previamente tratado con agua, se precipita un sólido

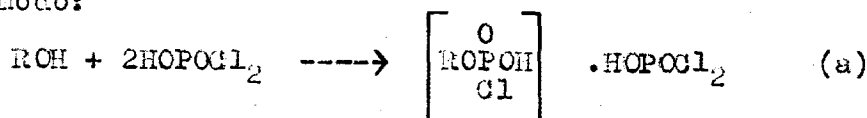
196204

20



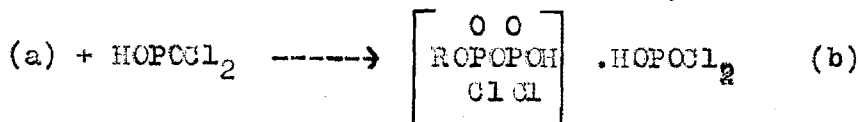
que puede ser separado por filtración, lavado con éter y se cado. De preferencia, se lleva a cabo la reacción con un ex ceso grande de agente de fosforilación y durante una exten sión de tiempo bastante larga, para estar seguro de que no

- 5. queda riboflavina sin fosforilar. Los productos que se obtie nen después de éello, contienen, a lo menos, dos átomos de fósforo y, por lo menos, un átomo de cloro. El alcance del polifosforilado depende de la duración de tiempo durante el cual se deja reaccionar la riboflavina con el POCl<sub>3</sub> previamen te tratado con agua. En el caso de POCl<sub>3</sub>, previamente tratado con un mol de agua, pueden formularse las reacciones del si guiente modo:

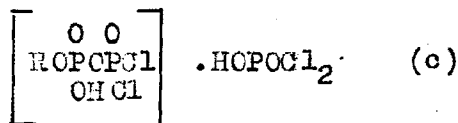


en la cual ROH representa riboflavina.

- 15. El clorofosfato de riboflavina monoclorofosforilado, antes indicado, puede ser, seguidamente, ulteriormente cloro fosforilado, dependiendo del tiempo reaccional, como sigue:



- 20. y/o



Los compuestos (b) y (c) pueden fosforilarse ulterior mente. En el caso de POCl<sub>3</sub>, previamente tratado con dos moles de agua, las reacciones correspondientes son:

- 25. 
$$ROH + 2(HO)_2POCl \longrightarrow \left[ \begin{array}{c} O \\ ROPOH \\ OH \end{array} \right] .(HO)_2POCl \quad (d)$$

Después de un tratamiento ulterior con el POCl<sub>3</sub>, pre viamente tratado con 2H<sub>2</sub>O, sucede lo siguiente:

- 30. 
$$(d) + (HO)_2POCl \longrightarrow \left[ \begin{array}{c} O O \\ ROPOPOH \\ OH OH \end{array} \right] .(HO)_2POCl \quad (e)$$

196204

20



El compuesto (e) puede ser fosforilado ulteriormente.

Los productos preparados de acuerdo con nuestro nuevo procedimiento comprenden sales de ácido mono (monoclorofosfórico) y sales de ácido mono (diclorofosfórico) de monoésteres de riboflavina de ácido fosfórico y ácidos polifosfóricos. La porción de ácido fosfórico, o ácido polifosfórico del éster puede contener cloro.

- 5.
- La hidrólisis de cualesquiera de los productos intermedios producidos con los ácidos clorofosfóricos, resulta, primero, por disociación de  $\text{HOPOCl}_2$ , o  $(\text{HO})_2\text{POCl}$  que forman sales, según el caso respectivo, seguida de la liberación de éster de ácido monofosfórico de riboflavina, designado del modo correspondiente como  $\text{RCPO}(\text{OH})_2$ . La magnitud de la polifosforilación no tiene importancia, ya que, en todos los casos, el producto final de hidrólisis es el citado éster de ácido monofosfórico de riboflavina. En tanto que el producto principal es un éster de 5', puede formarse, asimismo, una porción menor de éster de ácido (2'), (3'), (o 4') monofosfórico de riboflavina.
- 10.
- 15.
20. Queda entendido que no deseamos limitarnos por la anterior interpretación teórica de la formación de nuestros nuevos compuestos de riboflavina conteniendo fósforo y cloro, sino que más bien la destinamos como explicación razonable de las reacciones que puedan estar implicadas.
25. Si bien las sales de éster de la riboflavina, antes mencionadas, pueden aislarse para la finalidad de su purificación, o para la preparación de derivados de las mismas (por ejemplo, por reacción con amoníaco), no hace falta efectuar aislamiento para la preparación de nuestro éster de ácido monofosfórico de riboflavina. En el caso citado en último lugar,
- 30.



196204

es adicionada la mezcla reaccional, después del fosforilado de la riboflavina mediante  $\text{POCl}_3$ , previamente tratado con agua, es simplemente adicionada a unos volúmenes de agua fría, o hielo, y dejada en reposo durante unas cuantas horas. Durante este tiempo, el  $\text{POCl}_3$  previamente tratado con agua, residual que no ha reaccionado, es transformado por hidrólisis, completamente en ácidos fosfórico e hidroclopri

5.

co, y las sales de éster de riboflavina pasan por hidrólisis en el éster de ácido monofosfórico de riboflavina estable.

10.

La substancia, mencionada en último lugar, es aislada, seguidamente, por cristalización de la solución.

Los siguientes ejemplos ilustran nuestro nuevo método de preparación de éster de ácido monofosfórico de riboflavina, y de los nuevos productos intermedios. Se observa que dichas dilucidaciones no son restrictivas del alcance de nuestra invención.

15.

EJEMPLO 1.

A 61.3 g. de oxiclорuro de fósforo (0.4 moles) fueron paulatinamente adicionados, bajo buena agitación y refrigeración, a aproximadamente temperatura interior, 7.2 g (0.4 moles) de agua. La mezcla fué agitada hasta que la evolución de gas de cloruro de hidrógeno pareció en su mayor parte terminada, dejándose en reposo durante la noche. Seguidamente fué en

20.

friada la mezcla a  $5^{\circ}\text{C}$ ., adicionándose 3.76 g. de riboflavina bajo agitación. La solución completa tubo lugar rápidamente, siendo desarrollado  $\text{HCl}$ . Se mantuvo la solución durante 1 1/2 horas a  $5^{\circ}\text{C}$ ., y seguidamente durante 3 1/2 horas a temperatura ambiente. La solución fué paulatinamente adicionada bajo agitación a aproximadamente 500 cc. éter etílico anhidro.

25.

30.

El precipitado amarillo que vino formándose fué separado por

196204



Filtración, lavado a fondo con éter y secado en el vacío. Peso = 5,5 g. El análisis presentó un contenido de 2.4 átomos de fósforo por molécula. La sustancia estuvo higroscópica y olió a HCl. Se descompuso a alrededor de 150°C.

5.

EJEMPLO 2.

El producto del ejemplo 1 fué hidrolizado por adición del mismo a 100 cc. de agua. Se obtuvo una solución color ámbar claro, de la cual se cristalizó el éster de ácido monofosfórico de riboflavina en placas hexagonales. Se dejó la mezcla en reposo durante la noche para completar la cristalización. Seguidamente fué filtrada, lavada con alcohol y éter, y secada. El producto amarillo se fundió a aproximadamente 195°C., siendo analizado correctamente como éster de ácido monofosfórico de riboflavina, correspondiente a la fórmula

10.

15.

$C_{17}H_{19}N_4O_6PO_3H_2$ . La rotación óptica de una solución al 2 por ciento en ácido hidroclopórico concentrado fué de  $\alpha_{1D}^{28} = + 44.5^\circ$ .

En la titulación potenciométrica con hidróxido sódico, fué obtenido un punto de inflexión bien definido en la curva de titulación a un pH 4.5 después de la adición de exactamente un equivalente de álcali. Un segundo punto de inflexión fué

20.

obtenido a un pH de 8.5 después de la adición de un segundo equivalente de álcali. La sustancia se asemejó aparentemente a riboflavina, tuvo actividad biológica, si bien pudo fácilmente distinguirse por su mayor solubilidad en el agua,

25.

por el hecho que formó algo de gel después de su adición a agua, y por su formación de sales altamente hidrosolubles con hidróxidos alcalinos, amoníaco, dietanolamina y similares.

EJEMPLO 3.

30.

14.4 g (0.8 moles) de agua fueron adicionados a 61.3g.

196204

20



- (0.4 moles) de oxiclорuro de fósforo, como en el Ejemplo 1, dejando reposar la mezcla durante la noche. Se añadieron 3.76 g. de riboflavina bajo agitación, obteniéndose disolución rápida con evolución de gas HCl. Se dejó la solución en reposo a
5. temperatura ambiente durante 65 horas, siendo seguidamente añadidos, paulatinamente, a 500 cc. de éter anhidro. Se obtuvo un precipitado pardorrojizo que fué filtrado, lavado con éter y secado en el vacío. El producto presentó un peso de 6.2 g, indicando una polifosforilación mayor que en el Ejemplo 1. Este producto fué agregado a 62 cc. de dioxano, conteniendo 6 cc. de agua. Se produjo disolución, seguida por la cristalización de éster de ácido monofosfórico de riboflavina. Esta última substancia fué filtrada al día siguiente, lavada con dioxano y éter y secada. Sus propiedades fueron
10. similares a las del producto del Ejemplo 2.
- 15.

EJEMPLO 4.

- Se hizo reaccionar 3.76 g. de riboflavina con 61.3 g. de oxiclорuro fosfórico, previamente tratado con 7.2 g. de agua, exactamente como en el Ejemplo 1. La solución reaccional
20. fué vertida, seguidamente, en una mezcla de 200 g. de hielo y 200 g. de agua, y dejada en reposo durante la noche. Se fué cristalizando éster de ácido monofosfórico de riboflavina. Fué separado por filtración, lavado con ácido 3 N hidroclicórico, alcohol, éter, y secado. El producto fué similar al del
25. Ejemplo 2.

- Como ya se ha observado, el éster de ácido monofosfórico de riboflavina puede ser tratado con miras a la producción de sus sales. Resultan sales de interés particular, como la sal monosódica de éster de ácido monofosfórico de riboflavina y la sal monodietolamínica de éster de ácido monofosfórico
- 30.

196204

20



co de riboflavina. Estas sales resultan áltamente hidrosolubles y de particular valor para la preparaci3n de soluciones parenterales, así como para otras composiciones que contienen riboflavina. Se facilita a continuaci3n un método ilustrativo de la preparaci3n de la sal monos3dica de éster de ácido monofosf3rico de riboflavina:

Preparaci3n de sal monos3dica de éster de ácido monofosf3rico de riboflavina.

5. 4.56 g. de éster de ácido monofosf3rico de riboflavina son suspendidos en, aproximadamente, 100 cc. de agua, llevando el pH a 4.5, por adici3n de uno o dos hidr3xidos s3dicos normales. Prácticamente quedará la totalidad del éster disuelto después de agitaci3n prolongada y trituraci3n de las porciones transformadas en gel. La opalescencia, en el caso de presentarse, es eliminada por filtraci3n a través de un filtro de vidrio finamente incorporado. La soluci3n puede clarificarse, asimismo, por adici3n de un importe pequeño de niacina mida o etanolamida de ácido gentísínico, o llevado el pH a 9 por adici3n de NaOH, seguida de adici3n de ácido acético glucial al pH 4.5. Una vez obtenida una soluci3n clara a un pH de 4.5, se adicionan aproximadamente cinco volúmenes de etanol, resultando al efecto la precipitaci3n de la sal monos3dica de éster de ácido monofosf3rico de riboflavina. Este es separado por filtraci3n, lavado con etanol y éter, y secado en el vacío a 50°C. El producto constituye un polvo amarillo que pesa aproximadamente 4 g. Da una clara soluci3n acuosa en una concentraci3n de 25 mg.cc.

La invenci3n, dentro de su esencialidad, podrá llevarse a la práctica en otras variantes que las citadas a título de ejemplo, a las cuales alcanzará igualmente la protecci3n

196204

20



que se recaba. Podrá, pues, llevarse a la práctica con los medios, temperaturas y proporciones más convenientes a cada caso: por quedar todo éllo comprendido dentro del espíritu de las reivindicaciones.

N O T A

5. Hecha la descripción del presente invento, se hace constar que la presente solicitud se acoge a los derechos de prioridad de la patente estadounidense, número de serie, 141.585, depositada el día 31 de enero de 1950, y declaranse como nuevas y de propia invención, las siguientes reivindicaciones:
10. 1ª.- Procedimiento para la preparación de éster mono fosfórico de la lactoflavina, caracterizado por el hecho que hace disolverse lactoflavina en ácidos clorofosfóricos y que se hidroliza el producto reaccional.
15. 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado por el hecho de que el ácido clorofosfórico es preparado por reacción de un mol de oxiclórico de fósforo con aproximadamente 1 o 2 moles de agua.
20. 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado por el hecho que se hace disolver la lactoflavina en un ácido clorofosfórico preparado por tratamiento de oxiclórico de fósforo con 1 o 2 moles de agua, que se deja reposar la solución a temperatura ambiente, que se somete la solución o el producto intermedio que es obtenido de esta última, por
25. precipitación con éter a una hidrólisis; y que se transforma,

196204



eventualmente, el éster monofosfórico de la lactoflavina ob-  
tenido, en una sal, de preferencia, la sal sódica o dietanol-  
amínica.

5. 4ª.- Procedimiento para la preparación de éster mo-  
nofosfórico de la lactoflavina.

Según se describe y reivindica en la presente memoria  
descriptiva, que consta de once hojas, foliadas y escritas  
a máquina por una sola cara.

Madrid, a 20 de enero de 1951.

F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE, S.A.

p.a.

JAIMÉ ISERN MIRALLÉS

P. R.

