



347981



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

a favor de:

C.H. BOEHRINGER SOHN, de nacionalidad alemana, residente en Ingelheim am Rhein (Republica Federal Alemana) por:
"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE ESCILIGLAUCOSIDIN- α -L-RAMNOSIDO A PARTIR DE SCILLA MARITIMA ALBA"

- - - - -

Memoria descriptiva

Como se conoce ya de las investigaciones detalladas de Stoll y otras (comparar Ullmanns Enzyklopädie der technische Chemie, 3ª edición. vol. 8 (1957), página 234 y siguientes), la cebolla albarrana, Scilla (= Urginea) marítima Baker L., Var, alba, contiene un cierto número de glucósidos cardioactivos interesantes desde el punto de vista farmacológico. Recientemente, en particular la pros-



osilaridina-A, ha adquirido una importancia terapéutica considerable.

10 De manera sorprendente se ha encontrado ahora que se puede obtener a partir de la cebolla albarrana, otro glucosido que no ha sido descrito todavía en la bibliografía.

15 A fin de obtener el nuevo glucosido, se pueden utilizar las aguas madres que resultan de la producción de la proscilaridina-A. Estas aguas madres constituyen un material de partida particularmente económico. La producción de proscilaridina-A se realiza según los procedimientos conocidos en la bibliografía, haciendo fermentar con adición de agua, cebollas albarranas frescas o secas. La pulpa de fermentación se extrae con un disolvente apropiado, los extractos se separan del material residual mediante las etapas acostumbradas de purificación, y a continuación se separa mediante cristalización la proscilaridina-A que ha
20 sido producida por digestión enzimática, (véase por ejemplo Stoll Helv. Chim. Acta 16/703 (1933) o DAS 1 198 484). Las aguas madres de la cristalización contiene el nuevo glucosido conjuntamente con la proscilaridina-A restante y otros materiales residuales en cantidades considerables. El
25 nuevo glucosido es, de manera sorprendente y al contrario de la proscilaridina-A, bastante resistente a la hidrólisis, lo que según el invento, puede utilizarse con ventaja para
30



un método simple y económico de obtención y de purificación. A este objeto las aguas madres de la cristalización que se obtienen, como se ha descrito antes, durante el tratamiento de la proscillaridina-A, se evaporan, el residuo se disuelve en un disolvente adecuado, tal como por ejemplo metanol y se calienta a reflujo durante un corto tiempo con ácidos diluidos (preferentemente con ácidos sulfúrico acuoso al 1%). La escilaridina obtenida de esta manera a partir de la proscillaridina-A restante, puede separarse de una manera sencilla (por ejemplo por filtración). A continuación se purifica todavía más la solución de reacción de una manera conocida para el glucósido de escila. Por ejemplo, extrayendo varias veces la solución con tetracloruro de carbono se pueden separar las agluconas restantes y los demás materiales residuales y se puede aislar el glucósido bruto mediante nueva extracción de la solución de metanol/ácido sulfúrico con cloroformo/metanol o con cloroformo. Después de haber evaporado el extracto así obtenido, el residuo de glucósido puede ser prepurificado mediante cromatografía sobre gel de sílice con adición de 5% de agua utilizando un aluyente a base de cloruro de metileno/metanol (100:5) A partir de las fracciones enriquecidas con el nuevo glucósido, éste puede ser obtenido mediante otra cromatografía sobre gel de sílice con adición de 50% de agua y la utilización de un eluyente a base de acetato de etilo-



metanol saturado de agua (100:0,5) bajo la forma de agujas dispuestas en haces y el producto puede ser purificado mediante recristalización en acetona acuosa caliente al 50%.

El glucósido producido de esta manera, secado con vacío sobre pentóxido de fósforo a 80° C, ha mostrado mediante análisis elemental poseer la composición C = 65,25% H = 7,36% y O = 27,65%. A partir de estos elementos se ha calculado la fórmula general:



El nuevo glucósido está caracterizado por los siguientes datos.

Punto de fusión: 197-198° C (descomposición), no corregido)

70 Rotación óptica: $[\alpha]_D^{20} = -45,09 \pm 29$ (c = 1, metanol)

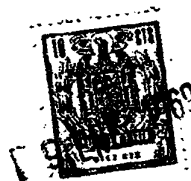
Espectro UV: máx. a 298 mm. (log. $\epsilon = 3,73$)

Espectro IR: máx. a 2700, 1710, 1640, y 1535 cm^{-1} , tal como se ve en la figura 1 que muestra el espectro infrarrojo del nuevo glucosido, verificado en pastillas de KBr.

75 reacciones de color: a) con reactivo Liebermann-Burchard: transición de colores desde violeta-rosa hasta azul-verde pasando por azul.

b) con reagente Rosenhein: negativo.

80 c) con ácido fórmico caliente concentrado: coloración verde.



Las características de cromatografía en capa fina sobre placa de gel de sílice G después de revelar tres veces con formiato de etilo saturado con agua como aluante (prueba mediante pulverización con $SbCl_3$ al 20%):

85

RF = 0,35, color: gris verdoso sucio: A título de comparación para la proscilaridina: RF = 0,42, color azul-violeta.

90 Cuando se hace reaccionar el glucósido con anhídrido acético en piridina anhidra, se produce un compuesto de tri-O-acetilo que tiene la composición $C_{36}H_{46}O_{12}$ (punto de fusión 185 - 188° C sin corrección, $[\alpha]_D^{20} = -34,6 \pm 2$ (c = 1, metanol)).

95 Cuando se hace reaccionar con clorhidrato de hidroxilamina, se produce una oxíma de composición $2-(C_{30}H_{41}O_9N) \cdot 1,5 H_2O$ (punto de fusión = 178 - 184° (descomposición): $[\alpha]_D^{20} = -41,0 \pm 2$

100 La hidrólisis ácida del glucósido en condiciones intensas (5 horas a 105° C con ácido sulfúrico acuoso al 1%) suministra una aglucona que tiene la composición $C_{24}H_{28}O_4$ (punto de fusión 223-228° C, $[\alpha]_D^{20} = -151$ (CHCl₃) Estas características corresponden a los valores para 3,5 - 3 anhidrosciliglaucosidina conocida en la bibliografía, (Stoll y otros, Helv. 35 2513 (1952)). Como azúcar ha sido aislado a partir de la solución de hidrólisis la L-ramnosa, la cual ha sido identificada por determinación del punto de

105



fusión de la rotación óptica y por medio de la comparación
cromatográfica. La p-bromofenilhidrazona realizada con el
azúcar demostró también las características de la L-ramnoso
110 p-bromofenilhidrazona.

Estos resultados demuestran que el nuevo glucósido es
el esciliglaucosidín- α -L-ramnosido.

El glucósido es interesante desde el punto de vista
farmacológico en razón de su acción cardioactiva, además,
115 puede utilizarse como producto intermedio para la obtención
de nuevos glucósidos cardioactivos.

El glucósido que se obtiene de conformidad con el in-
vento puede formularse con ayuda de los excipientes galéni-
cos acostumbrados y portadores disolventes y solubilizantes
120 y puede combinarse con otras sustancias cardioactivas (por
ejemplo glucósidos del tipo escila o digital, derivados de
pirimido-pirimidina, así como con derivados de la teofilina
que actúan a la vez como solubilizantes, tales como la 7- β -
oxipropilteofilina). Pueden realizarse combinaciones con
125 sustancias que tiene otras propiedades farmacodinámicas,
tales como los simpaticomiméticos. Como dosis oral para el
nuevo glucósido se puede utilizar 0,1 - 3 y preferentemente
0,15 - 1 mg.

Los siguientes ejemplos ilustran el invento sin carac-
130 ter limitativo:



A. Obtención

Ejemplo 1

135 La cebolla albarrana seca se hace fermentar añadiendo
la agua y se extrae a continuación con un disolvente adecuado
tal como metanol, cloroformo o acetato de etilo. Después del
tratamiento usual y de la purificación de los extractos, se
aisla la proscilaridina-A mediante recristalización en metanol
de la manera conocida. Las aguas madres obtenidas de esta
forma se evaporan y los residuos obtenidos se tratan para
140 obtener esciliglaucosidina-L-ramnosido.

Se disuelven en caliente 380 g. de residuo de glucósido
de la fabricación de la proscilaridina-A, en 3,8 litros de
metanol y se mezclan con agitación a 2,8 litros de ácido sulfúrico
acuoso al 1% a 50° C. Se calienta la solución en baño
145 maría durante 30-45 minutos a reflujo y se filtra en caliente
la escilaridina-A formada por hidrólisis de los residuos
de proscilaridina-A. Se obtiene 35 g. de escilaridina-A bruta.

150 La solución enfriada se extrae dos veces seguidas con
un litro de tetracloruro de carbono cada vez, con lo cual se
eliminan la escilaridina-A restante, las demás agluconas y
las impurezas lipofílicas (en total 39 g. de residuo seco).
La solución metanólica acuosa se extrae para aislar el nuevo
glucósido dos veces, con un litro de cloroformo cada vez y
155 a continuación se extrae tres veces con 0,5 litros cada vez



de una mezcla de cloroformo/metanol (1:1). Los extractos separados de cloroformo o de cloroformo/metanol se evaporan a sequedad con vacío a 50° C. Después de lo cual se obtienen 215 g. de un residuo de glucósido de color amarillo claro.

160

A fin de eliminar, la cantidad más importante de impurezas molestas, se somete el residuo a una purificación previa mediante cromatografía en columna.

165

A fin de preparar la columna, se humedecen con 110 ml. de agua 2,2 kg. de gel de sílice (por ejemplo gel de sílice de Merck, tamaño de gránulo 0,05-0,20 mm) y se ponen en suspensión con una mezcla de cloruro de metileno-metanol (100:5) en una columna de vidrio.

170

Se disuelven 215 g. de residuo de glucósido en 500 ml. de cloruro de metileno/metanol (100:5) se introducen en la columna y se cromatografían con la misma mezcla de disolventes. El extracto se separa en fracciones de 0,5 litros y se controla la composición de las fracciones individuales mediante cromatografía en capa fina. Después de que se haya

175

hecho circular un total de 14 litros de disolvente todas las impurezas que tienen un valor Rf más elevado que el del nuevo glucósido han sido eliminadas de la columna. Las fracciones separadas como previas contienen 118 g. de residuo seco. Las

180

siguientes fracciones (en total 3 litros de extracto) que contiene la totalidad del esciliglaucosidin- α -L-ranósido,



son reunidas y se destila el disolvente con vacío a una temperatura del baño de 50º C. Se obtiene como residuo 73 g. de una sustancia débilmente amarilla. A fin de realizar una purificación más completa de la sustancia, se la somete a una nueva cromatografía sobre gel de sílice. A este objeto se llena una columna con un kilo de gel de sílice añadiendo 500 ml. de agua, se disuelve el glucósido bruto en 200 ml. de una mezcla de acetato de etilo saturado en agua y metanol (100:0,5) se introduce esta mezcla en la columna y se cromatografía con la misma mezcla de disolventes. Después de una elución previa con 0,5 litros el glucósido se aluye de la columna. De la fracción principal (1 litro de extracto) cristaliza después de un corto tiempo el nuevo glucósido en forma de agujas dispuestas en haces. Después de que haya cristalizado durante 24 h. el glucósido se separa por filtración, se lava y se seca con vacío a 60º C.

El rendimiento es de 35,5 g de esciliglaucosidina- α -L-ramnósido puro. A partir de las aguas madres de la cristalización se pueden obtener después de una nueva cromatografía 5,5 g. de glucósido. Después de recristalización en una mezcla acetona-agua (1:1) se obtienen el glucósido en agujas incoloras. Estas agujas tienen después del secado con vacío a 80º C sobre pentóxido de fósforo un punto de fusión de 197 - 198º C (descomposición) y una rotación óptica de $[\alpha]_D^{20} = -45,02 \pm 22$ (en metanol).



Ejemplo 2

Se disuelven 200 g. de residuo de glucósido procedente de la fabricación de proscilaridina-A a partir de cebolla albarrana seca de procedencia india en 2 litros de metanol calentándolos a reflujo. Después del enfriamiento de la solución a 35° C se mezcla agitándola con dos litros de ácido sulfúrico al 1% caliente (35° C). La solución de reacción se agita durante 3 horas a 35° C y a continuación se extrae por filtración la escilaridina-A separada. El filtrado enfriado se extrae dos veces con 0,5 litros de tetracloruro de carbono cada vez. A continuación a fin de aislar el esciliglaucosidin- α -L-ramnósido, se extrae dos veces con 0,5 litros de cloroformo cada vez y a continuación tres veces con 0,3 litros de una mezcla de cloroformo/metanol (1:1) cada vez. Los extractos de cloroformo o de cloroformo/metanol separados se purifican y se secan sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la destilación del disolvente, se obtienen 140 g. de residuo de glucósido. Las impurezas se eliminan a continuación como se describe en el ejemplo 1, mediante cromatografía del residuo sobre 1,4 Kgs. de gel de sílice con adición de 5% de agua utilizando una mezcla de cloruro de metileno/metanol (100:5) como eluyente. El residuo seco obtenido a partir de las fracciones que contiene esciliglaucosidin- α -L-ramnósido (85 g.) se cromatografía a fin de realizar una purificación más completa tal como se describe en el

210
215
220
225
230



ejemplo 1, sobre 1,2 kgs, de gel de sílice con 600 ml, de agua y una mezcla de acetato de etilo saturado con agua y metanol (100:0,5). El esciliglaucosidin- α -L-ramnósido (38 g) cristalizado a partir de la fracción principal, se separa y se purifica mediante recristalización en acetona acuosa al 50%. Las características físicas corresponden a las de la sustancia del ejemplo 1.

235

B. Formulación (Gotas para administración oral)

	(-)-1-p-hidroxifenil-2-metil	
240	aminoetanol-(1)	50,00 g.
	nuevo glucósido (esciliglaucosidin- α -L-ramnósido)	0,25 g.
	7- β -oxipropilteofilina	200,00 g.
	Na ₂ S ₂ O ₅	1,50 g.
245	Sal sódica del ácido	
	Etilendiaminotetracético	1,50 g.
	ácido tartárico	3,75 g.
	sacarina sodica	1,00 g.
	éster metílico del ácido p-hidroxibenzoico	0,45 g.
250	éster propílico del ácido p-hidroxibenzoico	15,00 g.
	etanol	75,00 g.
	agua destilada	hasta 1500,00 ml.

255 Se disuelve el nuevo glucósido en etanol, los ésteres del ácido p-hidrobenczoico se disuelven en la cantidad total de agua caliente. Después de enfriamiento todas las



260 demás sustancias se disuelven y se junta la solución acuosa a la solución etanólica del nuevo glucósido. 20 gotas corresponden a 1,5 ml de solución. El valor del pH de la solución es 5,0; si se requiere puede ser ajustado perfectamente mediante una solución tampón.

REIVINDICACIONES

265 1.- Procedimiento para la obtención de esciliglucosidina- α -L-ramnósido a partir de cebolla albarrana, caracterizado en purificar la cebolla albarrana, en someter a tratamiento hidrolítico las fracciones que contienen proscilaridina-A, en particular el residuo de las aguas madres de la cristalización procedentes de la fabricación convencional de la proscilaridina-A, en separar la escilaridina producida de esta manera de la proscilaridina-A y en purificar la solución de reacción según los métodos ya conocidos para la purificación de glucósidos de escila.

275 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por evaporar las aguas madres obtenidas a partir de la obtención de proscilaridina-A de manera convencional, por disolver el residuo en metanol, por calentar durante un tiempo corto la solución con ácido diluidos, por separar la escilaridina obtenida, por extraer la solución de reacción en primer lugar con tetracloruro de carbono y a continuación con cloroformo, así como con cloroformo/metanol (1:1), por reunir los extractos de cloroformo o de cloroformo/metanol y por evaporarlos

280



a sequedad, y por purificar el residuo obtenido de esta forma por cromatografía sobre gel de sílice.

285 3).- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por hidrolizar el residuo obtenido a partir de las aguas madres de la obtención acostumbrada de procilaridina-A con ácido sulfúrico al 1% acuoso, por separar la escilaridina obtenida y, en primer lugar, por cromatografiar el residuo obtenido por elución con cloroformo o cloroformo/metanol después de la elación previa con tetracloruro de carbono sobre gel de sílice con adición de 5% de agua, mientras se aplica un eluyente tal como el cloruro de metileno/metanol (100:5) y, cromatografiando seguidamente las fracciones que contienen el esciliglaucosidin- α -L-ramnósido sobre gel de sílice con adición de 50% de agua
290 mientras se aplica un aluyente a base de acetato de etilo saturado de agua/metanol (100:5).
295

4).- "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE ESCILIGLAUCOSIDIN- α -L-RAMNOSIDO A PARTIR DE SCILLA MARITIMA ALBA"

300 Esta memoria consta de 13 hojas foliadas y mecanografiadas por un solo lado de sus caras.

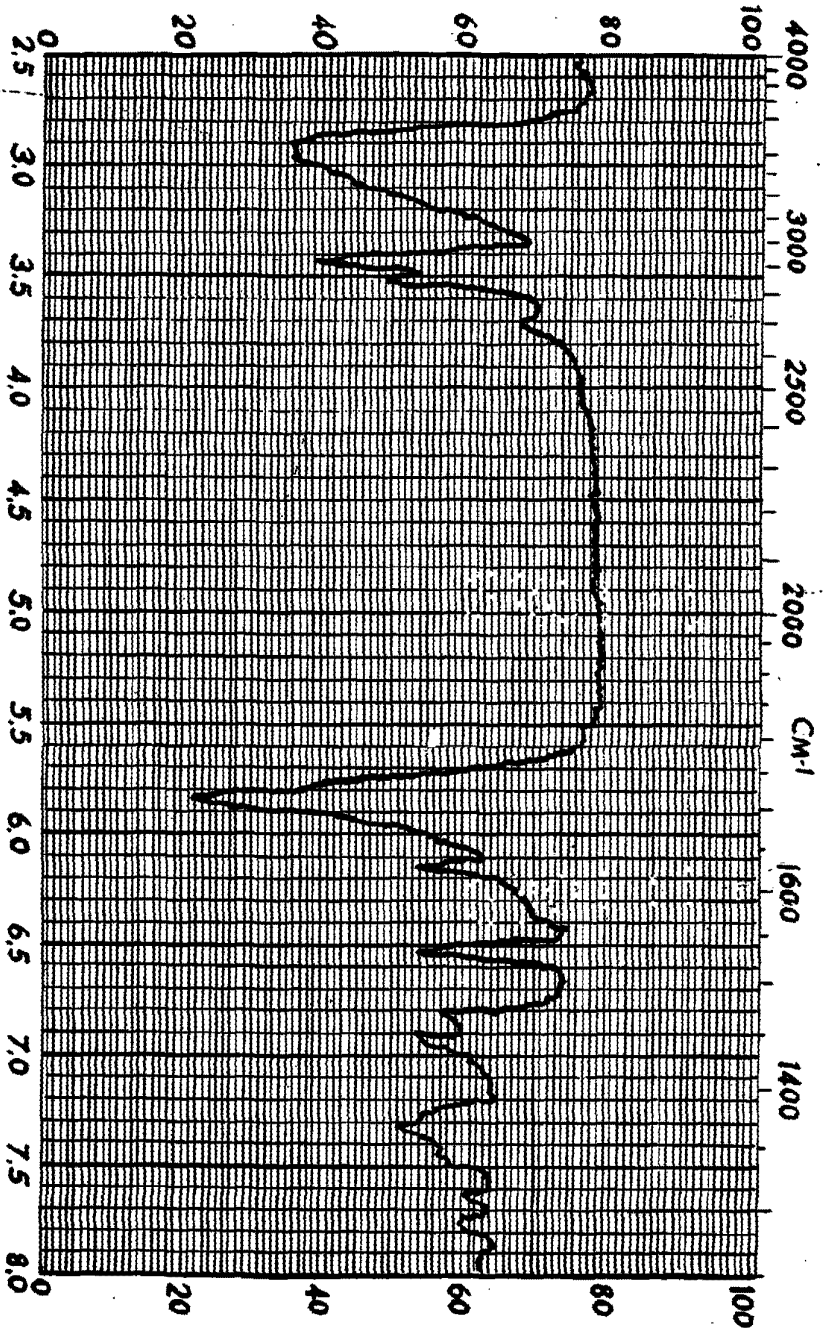
Madrid, 5 de Diciembre de 1967

L. F. DUEHRINGER JOHN

347.981

347.981

-Hoja univ-



Escala variable
Madrid 5 Diciembre de 1967

Dar