



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00886**

(22) Data de depozit: **26.11.2012**

(41) Data publicării cererii:
30.05.2014 BOPI nr. **5/2014**

(71) Solicitant:

- **BACÂREA PETRUŞ FĂNEL,**
STR. GHEORGHE MARINESCU NR. 66,
AP. 16, TÂRGU-MUREŞ, MS, RO;
- **BACÂREA VLADIMIR CONSTANTIN,**
STR. GH. MARINESCU NR. 66, AP. 18,
TÂRGU-MUREŞ, MS, RO;
- **BACÂREA ANCA,** STR. GH. MARINESCU
NR. 66, AP. 18, TÂRGU-MUREŞ, MS, RO

(72) Inventatori:

- **BACÂREA PETRUŞ FĂNEL,**
STR. GHEORGHE MARINESCU NR. 66,
AP. 16, TÂRGU-MUREŞ, MS, RO;
- **BACÂREA VLADIMIR CONSTANTIN,**
STR. GH. MARINESCU NR. 66, AP. 18,
TÂRGU-MUREŞ, MS, RO;
- **BACÂREA ANCA,** STR. GH. MARINESCU
NR. 66, AP. 18, TÂRGU-MUREŞ, MS, RO

(54) METODĂ DE SEPARARE A ENANTIOMERILOR α-AMINOACIZILOR BAZICI SAU ACIZI

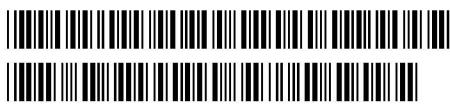
(57) Rezumat:

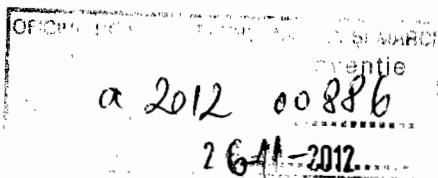
Invenția se referă la o metodă de separare a enantiomerilor α-aminoacizilor bazici sau acizi, pentru utilizare în sinteza unor compuși fiziologic activi. Procedeul conform inventiei constă din tratarea amestecului racemic cu o sare solubilă de cupru bivalent și o cantitate echivalentă dintr-un enantiomer al unui α-aminoacid cu caracter acido-bazic opus, din care rezultă complecși diastereomeri micști de cupru bivalent, separarea prin filtrare a diastereomerului heterochiral, descompunerea complexului, îndepărțarea

cuprului prin transformare într-un compus insolubil, urmat de filtrare și reținerea pe o răsină cationică a celor doi α-aminoacizi aflați în filtrat, eluarea selectivă, cu soluție de hidroxid de sodiu, la pH 5.6 și, respectiv, 10,5...11,5, cristalizarea prin adăugarea de solvent organic miscabil cu apa, filtrarea cristalelor, spălarea cu solvent și uscarea acestora.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conjunite în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





METODĂ DE SEPARARE A ENANTIOMERILOR α -AMINOACIZILOR BAZICI SAU ACIZI

Invenția se referă la o metodă de separare a enantiomerilor α -aminoacizilor bazici sau acizi, destinată obținerii unui anumit enantiomer din amestecul recemic, rezultat din sinteza chimică sau racemizarea aminoacizilor naturali, în scopul utilizării la sinteza unor compuși fiziologic activi (medicamente, pesticide, cosmetice, arome și coloranți alimentari, etc.).

În scopul separării enantiomerilor α -aminoacizilor sunt cunoscute numeroase metode: cristalizarea selectivă (aplicabilă în cazul rar când enantiomerii au solubilitate mai mică decât compusul racemic), rezoluția optică prin formare de săruri diastereomere, cromatografie chirală, sau combinații ale acestora. În U.S. Patent 2940998 din anul 1960, Tetsuo Ogawa și alții prezintă o metodă de separare a enantiomerilor acidului D,L-glutamic prin cristalizare selectivă în condiții stricte de temperatură, agitare, suprasaturație, pH, viteză de răcire și altele, din soluția suprasaturată, prin îsămânțare cu enantiomerul dorit. Cristalele separate se supun recristalizărilor succesive pentru a obține puritatea optică necesară. Metoda prezintă dezavantajul că se poate aplica numai la puținele substanțe care cristalizează ca agregate de cristale (solubilitatea enantiomerilor este mai mică decât a compusului racemic), randamentul după 10 cicluri complete este mic (25%), puritatea optică nu este suficientă fiind necesare mai multe recristalizări, iar procesul este laborios, greu de controlat și de productivitate mică.

Se cunoaște, de asemenea, o metodă de separare a enantiomerilor (U.S. Patent 4533506 din 1985) asemănătoare cu cea anterioară, cu deosebirea că însămânțarea se face nu cu enantiomerul dorit ci cu antipodul optic al altui aminoacid, care blochează cristalizarea enantiomerului aparținând seriei stereochimice opuse. Metoda prezintă aceleași dezavantaje ca cea discutată anterior.

În același scop, în U.S. Patent 6372936 din anul 2000, se prezintă o metodă de separare a enantiomerilor prin formarea de săruri diastereomere. Cum α -aminoacizii sunt substanțe

amfotere, conținând în structură atât grupări funcționale bazice cât și acide, pentru formarea de săruri diastereomere cu un selector chiral bazic este necesară blocarea prealabilă a funcțiunii α -amino, iar pentru utilizarea unui selector chiral acid, blocarea α -carboxilului. Metoda prezintă dezavantajul necesității protejării prealabile a unor grupe funcționale prin transformare în derivați și a deprotectării, după separarea chirală, care, pe lângă complexitate, cost și pierderi de randament, prezintă și riscul unei reracemizări parțiale. În plus, este dificil de găsit selectorul chiral adecvat.

Se cunoaște, de asemenea, o metodă (DE 000001932190 A din 1968) care presupune separarea enantiomerilor α -aminoacizilor prin cromatografie pe suport chiral obținut prin grefarea pe o răsină polistirenică a unor resturi de L-prolină și complexarea acestora cu ionul Cu^{2+} . Funcție de afinitatea sterică a celor doi enantiomeri față de Cu^{2+} semichelatizat, fixat pe răsină, timpii de retenție se diferențiază permitând separarea chirală. Metoda se pretează mai mult analizei HPLC. Pentru aplicare preparativă, prezintă dezavantajul unei productivități foarte scăzute și a unui consum de solvent inaceptabil.

În același scop, sunt cunoscute și metode care combină separarea chirală prin cristalizare selectivă cu metode cromatografice, membrane enantioselective, sau complecși supramoleculari (exemplu: U.S. Patent 7820860 din 2010), care prezintă dezavantajul prețului ridicat și productivității reduse.

Scopul prezentei invenții este realizarea unei metode eficiente, reproductibile, ușor de aplicat industrial, pentru separarea enantiomerilor α -aminoacizilor bazici sau acizi.

Problema pe care o rezolvă invenția este sinteza și descompunerea, în condiții la fel de simple ca în cazul sărurilor diastereomere, a unor complecși diastereomeri homo și heterochirali, care asigură un randament de separare ridicat și o puritate optică suficientă. Metoda se bazează pe observația (Bacârea, P.F. și alții, Rev.Chim.**61**, 7, 2001, p. 676; Bacârea, P.F., și alții, Rev.Chim., **63**, 5. 2012; Sakurai, T., și alții, Bull. Chem. Soc. Japan, **49**, 1, 1976, p. 169) că interacțiunile supramoleculare între grupele funcționale din catenele laterale ale aminoacizilor bazici sau acizi aduse în proximitate prin complexare cu ionul Cu^{2+} , funcție de apartenența chirală, induc asocierea intramoleculară sau intermoleculară cu consecințe nete

asupra solubilității. Această diferență de solubilitate între complecșii micști diastereomeri, homo și heterochirali ai Cu²⁺ cu un aminoacid bazic și unul acid este exploatață în prezenta invenție.

Metoda, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate mai sus prin aceea că, prin tratarea în condiții optime a unui amestec racemic al unui α-aminoacid bazic (de exemplu: arginină, lizină, ornitină), în soluție apoasă, cu o sare solubilă de Cu²⁺ și cu cantitatea echivalentă de L sau D-aminoacid acid (de exemplu, acid glutamic sau acid aspartic) și reglarea pH-ului la 7,5-8,5 cu soluție de hidroxid de sodiu, rezultă perechi de diastereomeri homo și heterochirali (de exemplu: L-ArgCuL-Glu și D-ArgCuL-Glu, L-ArgCuL-Asp și D-ArgCuL-Asp, L-LysCuL-Glu și D-LysCuL-Glu, L-LysCuL-Asp și D-LysCuL-Asp, L-OrnCuL-Glu și D-OrnCuL-Glu, L-OrnCuL-Asp și D-OrnCuL-Asp, L-GluCuL-Arg și D-GluCuL-Arg, L-AspCuL-Arg și D-AspCuL-Arg, etc.) cu solubilități foarte diferite, care se pot separa prin simplă filtrare. Diastereomerii separați sunt descompuși prin acidulare cu un acid tare, diluat, la pH 1,5-3. Cu²⁺ este redus la Cu⁰ cu o soluție de borohidrură de sodiu, sau transformat într-un compus insolubil (sulfură sau polisulfură) prin barbotarea de H₂S sau dozarea unei soluții de sulfură, sulfură acidă sau polisulfură, sau într-un complex insolubil mult mai stabil, de exemplu, cu oxichinolină. Compusul insolubil de cupru se separă prin filtrare, iar amestecul de aminoacid bazic și aminoacid acid sub formă de cationi, rezultat în soluție, este reținut pe o răsină schimbătoare de ioni, de exemplu, Amberlite IRA-120. După spălarea răsinii cu apă, aminoacidul acid este eluat prin aducerea pH-ului la valoarea de 5-6 cu soluție de hidroxid de sodiu 10-40%. Rășina se separă prin filtrare, se spală cu apă. Filtratul care conține sarea monosodică a aminoacidului acid se concentrează prin evaporarea apei și se poate reutiliza la șarja următoare. Rășina care mai reține aminoacidul bazic este suspendată în apă, iar pH-ul este ridicat la 10,5-11,5 cu soluție de hidroxid de sodiu 10-40%. Se separă rășina prin filtrare și, după regenerare acidă se poate reutiliza. Lichidul care conține aminoacidul bazic eluat este tratat cu un solvent organic miscibil cu apa, de exemplu, metanol, etanol, acetonă, enantiomerul aminoacidului bazic precipită, este separat prin filtrare, spălat pe filtru cu solvent și uscat. Filtratul care conține diastereomerul homochiral solubil se tratează la fel pentru recuperarea aminoacizilor și reutilizarea acestora.

Metoda, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- Este aplicabilă indiferent de solubilitatea naturală a enantiomerilor în comparație cu compusul racemic.
- Este reproductibilă, ușor de aplicat industrial (controlul fabricației este simplu, nu necesită catalizatori sau reactivi speciali, nici utilaje special adaptate), eficientă (se lucrează la temperatura camerei, cu reactivi comuni care pot fi recuperati și reutilizați), productivă și capabilă să asigure o puritate optică suficientă.
- Este ecologică; nu se lucrează cu substanțe toxice sau agresive asupra mediului, iar apele reziduale conțin numai ioni comuni (sodiu, clorură,), sau concentrații foarte mici de substanțe rapid biodegradabile (aminoacizi).

Se dă, în continuare, un exemplu reprezentativ de realizare a invenției, care nu limitează aplicabilitatea la acest caz.

50 mmoli D,L-Arg (8,7 g) și 50 mmoli L-Glu (7,35 g) se dizolvă în 50 ml apă. Se adaugă 50 mmoli CuCl₂ (6,75 g). După dizolvare, sub agitare, cu o soluție de NaOH 10 % se aduce pH-ul la 7,5-8,5. Se mai agită 0,5 ore, apoi se lasă la cristalizare 10-20 ore (peste noapte). La reluare, se agită energetic 10-15 minute, apoi se filtrează. Precipitatul cristalin se spală pe filtru de două ori cu câte 15 ml apă rece. Acest precipitat conține complexul mixt al D-Arg și L-Glu cu ionul Cu²⁺. Filtratul conține complexul solubil al L-Arg și L-Glu. Precipitatul se prelucrează pentru obținerea D-Arg. Se suspendă în 40 ml apă și se acidulează cu acid clorhidric 10 % la pH 2-3, când complexul se descompune. Pentru separarea Cu²⁺ din soluție, se picură 10-12 ml soluție 30 % NaHS, sub agitare energetică și ventilație de exhaustare pentru îndepărțarea eventualului H₂S degajat. Precipitatul negru de sulfură de cupru se filtrează și se spală pe filtru cu 2x10 ml apă. Filtratul se adaugă peste 100 ml (80 g) răsină cationică Amberlit IR 120 H (forma acidă), umedă. Se agită ușor, pentru omogenizare, timp de o oră. Se face o probă de prezență aminoacid, din lichid. (Peste 1 ml soluție probă se adaugă 1 ml suspensie 1M Cu(OH)₂ proaspăt preparată și, cu soluție 5% Na₂CO₃ se ridică pH-ul la 7-8. Dacă în lichidul supernatant limpede nu apare culoarea albastru, înseamnă că aminoacizii au fost fixați în întregime pe răsină). Se spală răsina de două ori cu apă (apa de spălare să depășească nivelul răsinii). Pentru eluarea selectivă a L-Glu se

U-2012-0088
26-11-2012

adaugă soluție de NaOH 10 % încet, sub agitare lentă, așa încât pH-ul să se mențină 0,5 ore la 5-6. Se separă lichidul care conține glutamatul monosodic. Rășina se spală de două ori cu apă, apoi se ridică pH-ul la 10,5-11,5 cu soluție 10 % NaOH și se menține 0,5 ore sub agitare lentă. Se separă lichidul din care se precipită D-Arg prin adăugarea cantității necesare de metanol. Se filtrează. Cristalele se spală pe filtru cu 2x10 ml metanol și se usucă la temperatură sub 50 °C. Rezultă 3,2 g D-Arg (randament față de teoretic posibil, 82%). Metanolul din filtrat se recuperează prin distilare și se poate folosi la șarja următoare. Filtratul care conține L-Glu se concentrează prin distilarea apei în vid și se poate utiliza la șarja următoare. Filtratul care conținea complexul solubil L-ArgCuL-Glu se prelucrează la fel ca precipitatul D-ArgCuL-Glu. Se recuperază L-Glu și se poate refolosi, iar L-Arg recuperată se poate racemiza și reintroduce în proces.

REVENDICĂRI

1. Metodă de separare a enantiomerilor α -aminoacizilor bazici sau acizi caracterizată prin aceea că utilizează complecșii diastereomeri homo și heterochirali ai cuprului bivalent cu un α -aminoacid bazic și unul acid.
2. Metodă, conform revendicării anteroioare care, în scopul separării enantiomerilor unui α -aminoacid bazic sau acid, amestecul racemic al acestuia este transformat în complecșii diastereomeri micști de cupru bivalent prin tratare cu o sare solubilă de cupru bivalent și cantitatea echivalentă dintr-un enantiomer al unui α -aminoacid cu caracter acido-bazic opus, separarea prin filtrare a diastereomerului heterochiral, care cristalizează, de cel homochiral, care rămâne în soluție, descompunerea complexului prin acidulare cu un acid tare la pH 1,5-3, îndepărțarea cuprului prin transformare într-un compus insolubil și filtrare, urmată de reținerea pe o răsină cationică a celor doi α -aminoacizi aflați în filtrat, eluarea selectivă cu soluție de hidroxid de sodiu, la pH 5-6 și, respectiv, 10,5-11,5, cristalizarea prin adăugarea de solvent organic miscibil cu apa, filtrarea cristalelor, spălarea cu solvent și uscarea acestora.