



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **26/11/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/10/2016** BOPI nr. **10/2016**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2014 BOPI nr. **5/2014**

(73) Titular:

- **BACĂREA PETRUȘ FĂNEL**,
STR. GHEORGHE MARINESCU NR. 66,
AP. 16, TÂRGU-MUREȘ, MS, RO;
- **BACĂREA VLADIMIR CONSTANTIN**,
STR. GH. MARINESCU NR. 66, AP. 18,
TÂRGU-MUREȘ, MS, RO;
- **BACĂREA ANCA**, STR. GH. MARINESCU
NR. 66, AP. 18, TÂRGU-MUREȘ, MS, RO

(72) Inventatori:

- **BACĂREA PETRUȘ FĂNEL**,
STR. GHEORGHE MARINESCU NR. 66,
AP. 16, TÂRGU-MUREȘ, MS, RO;
- **BACĂREA VLADIMIR CONSTANTIN**,
STR. GH. MARINESCU NR. 66, AP. 18,
TÂRGU-MUREȘ, MS, RO;
- **BACĂREA ANCA**, STR. GH. MARINESCU
NR. 66, AP. 18, TÂRGU-MUREȘ, MS, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:

**TAKESHI S., Ș.A., "MIXED LIGAND
COPPER(II) COMPLEXES OF
ALPHA-AMINO ACIDS WITH
LIGAND-LIGAND INTERACTIONS",
BULLETIN OF THE CHEMICAL SOCIETY
OF JAPAN, VOL. 49(1), PP. 169-173, 1976;**
**BACĂREA P., Ș.A., CHIRAL SELECTIVITY
IN THE BASIC OR ACID
ALPHA-AMINOACIDS HOMOMERIC Cu(II)
COMPLEXES RANGE", REV. CHIM., VOL.
63, 2012; BACĂREA P., Ș.A., "CHIRAL
AUTO-RESOLUTION OF L AND
D-ARGININE MIXTURE USING THEIR Cu(II)
DIASTEREOMERES COMPLEXES", REV.
CHIMIE, VOL. 61, 2010**

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



RO 129455 B1

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

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

19 Se cunoaște, de asemenea, din **US 4533506**, din 1985, o metodă de separare a
enantiomerilor asemănătoare cu cea anterioară, cu deosebirea că însămânțarea se face nu
21 cu enantiomerul dorit, ci cu antipodul optic al altui aminoacid, care blochează cristalizarea
enantiomerului aparținând seriei stereochemice opuse. Metoda prezintă aceleași dezavantaje
23 ca cea discutată anterior.

În același scop, în **US 6372936**, din anul 2000, se prezintă o metodă de separare a
25 enantiomerilor prin formarea de săruri diastereomere. Cum α -aminoacizii sunt substanțe
amfotere, conținând în structură atât grupări funcționale bazice, cât și acide, pentru formarea
27 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.
29 Metoda prezintă dezavantajul necesității protejării prealabile a unor grupe funcționale prin
transformare în derivați, și a deprotejării, după separarea chirală, care, pe lângă complexi-
31 tate, cost și pierderi de randament, prezintă și riscul unei rracemizări parțiale. În plus, este
dificil de găsit selectorul chiral adecvat.

33 Se cunoaște, de asemenea, din **DE 00001932190 A**, din 1968, o metodă care
presupune separarea enantiomerilor α -aminoacizilor prin cromatografie pe suport chiral,
35 obținut prin grefarea pe o rășină polistirenică a unor resturi de L-prolină, și complexarea
acestora cu ionul Cu^{2+} . În funcție de afinitatea sterică a celor doi enantiomeri față de Cu^{2+}
37 semichelatizat, fixat pe rășină, timpii de retenție se diferențiază, permițând separarea chirală.
Metoda se pretează mai mult analizei HPLC. Pentru aplicare preparativă, prezintă
39 dezavantajul unei productivități foarte scăzute și al unui consum de solvent inacceptabil.

În același scop, sunt cunoscute și metode care combină separarea chirală prin
41 cristalizare selectivă cu metode cromatografice, membrane enantioselective sau complecși
supramoleculari, de exemplu, din **US 7820860**, din 2010, care prezintă dezavantajul prețului
43 ridicat și al productivității reduse.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în creșterea randamentului de separare
45 și a purității optice a enantiomerilor α -aminoacizilor bazici sau acizi.

Metoda de separare a enantiomerilor α -aminoacizilor bazici sau acizi, prin tratarea
47 amestecului racemic cu o sare solubilă de cupru divalent și o cantitate echivalentă dintr-un
enantiomer al unui α -aminoacid cu caracter acid sau bazic opus enantiomerului de interes,

RO 129455 B1

conform invenției, înlătură dezavantajele menționate prin aceea că amestecul de diastereoizomeri homo- și heterochirali se separă prin filtrare, iar precipitatul conținând diastereoizomerul heterochiral se acidulează cu un acid tare până la pH 1,5...3, după care se adaugă prin picurare un compus selectat dintre borohidruură de sodiu sau o sulfură, sulfură acidă sau o polisulfură, sau se barbotează hidrogen sulfurat, pentru a se obține sarea de cupru insolubilă, care se filtrează, iar filtratul este trecut peste o rășină cationică și eluat selectiv cu hidroxid de sodiu la pH 5...6, când se separă ligandul acid ca sare monosodică și, respectiv, la pH 10,5...11,5, când se separă enantiomerul care ulterior cristalizează din soluția în care s-a adăugat un solvent organic miscibil cu apa.

Metoda se bazează pe observația (Bacărea, P. F. și alții, Rev. Chim. 61, 7, 2001, p. 676; Bacărea, 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+} , în funcție de apartenența chirală, induc asocierea intramoleculară sau intermoleculară, cu consecințe nete asupra solubilității. Această diferență de solubilitate între complexii micști diastereomeri, homo- și heterochirali ai Cu^{2+} cu un aminoacid bazic și unul acid este exploatată în prezenta invenției.

Metoda conform invenției constă în 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 Cu^{2+} 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. Cu^{2+} este redus la Cu^0 cu o soluție de borohidruură de sodiu, sau transformat într-un compus insolubil (sulfură sau polisulfură), prin barbotarea de H_2S 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 rășină schimbătoare de ioni, de exemplu, Amberlite IRA-120. După spălarea rășinii 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, apoi 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, acetona; 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 recuperați și reutilizați), productivă și capabilă să asigure o puritate optică suficientă;

RO 129455 B1

1 - 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
3 substanțe rapid biodegradabile (aminoacizi).

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

Exemplu

7 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 CuCl_2 (6,75 g). După dizolvare, sub agitare, cu o soluție de NaOH 10% se
9 aduce pH-ul la 7,5...8,5. Se mai agită 0,5 h, apoi se lasă la cristalizare 10...20 h (peste
noapte). La reluare, se agită energic 10...15 min, apoi se filtrează. Precipitatul cristalin se
11 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 Cu^{2+} . Filtratul conține complexul solubil al L-Arg și L-Glu. Precipitatul
13 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 Cu^{2+} din
15 soluție, se picură 10...12 ml soluție 30% NaHS, sub agitare energică și ventilație de
exhaustare, pentru îndepărtarea eventualului H_2S degajat. Precipitatul negru de sulfură de
17 cupru se filtrează și se spală pe filtru cu 2 x 10 ml apă. Filtratul se adaugă peste 100 ml (80
g) rășină cationică Amberlit IR 120 H (forma acidă), umedă. Se agită ușor, pentru
19 omogenizare, timp de 1 h. Se face o probă de prezență de aminoacid, din lichid. (Peste 1 ml
soluție probă se adaugă 1 ml suspensie 1 M $\text{Cu}(\text{OH})_2$ proaspăt preparată, și cu soluție 5%
21 Na_2CO_3 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 rășină.) Se spală rășina de
23 două ori cu apă (apa de spălare să depășească nivelul rășinii). Pentru eluarea selectivă a
L-Glu se adaugă soluție de NaOH 10% încet, sub agitare lentă, așa încât pH-ul să se
25 mențină 0,5 h 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
27 0,5 h 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 2 x 10 ml metanol,
29 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.
31 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
33 ca precipitatul D-ArgCuL-Glu. Se recuperează L-Glu și se poate refolosi, iar L-Arg recuperată
se poate racemiza și reintroduce în proces.

RO 129455 B1

Revendicare

1

Metodă de separare a enantiomerilor α -aminoacizilor bazici sau acizi prin tratarea
amestecului racemic cu o sare solubilă de cupru divalent, și o cantitate echivalentă dintr-un
enantiomer al unui α -aminoacid cu caracter acid sau bazic opus enantiomerului de interes,
caracterizată prin aceea că amestecul de diastereoizomeri homo- și heterochirali se separă
prin filtrare, iar precipitatul conținând diastereoizomerul heterochiral se acidulează cu un acid
tare până la pH 1,5...3, după care se adaugă prin picurare un compus selectat dintre
borohidruură de sodiu sau o sulfură, sulfură acidă sau o polisulfură, sau se barbotează
hidrogen sulfurat, pentru a se obține sarea de cupru insolubilă, care se filtrează, iar filtratul
este trecut peste o rășină cationică și eluat selectiv cu hidroxid de sodiu la pH 5...6, când se
separă ligandul acid ca sare monosodică și, respectiv, la pH 10,5...11,5, când se separă
enantiomerul care ulterior cristalizează din soluția în care s-a adăugat un solvent organic
miscibil cu apa. 13



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 488/2016