

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS
—

(11) N° de publication :
(à utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 636 331

(21) N° d'enregistrement national :

88 11854

(51) Int Cl⁵ : C 07 F 9/10.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 12 septembre 1988.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 11 du 16 mars 1990.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

(71) Demandeur(s) : Société anonyme dite : BIOEUROPE. —
FR.

(72) Inventeur(s) : Jacques Périe ; Pierre Frédéric Monsan ;
Michèle Jeanne Willson ; Alain Klæbe ; Nancy Jeanne
Lauth ; Philippe André Thibault.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet De Boisse.

(54) Procédé de préparation d'acides lysophosphatidiques et de sels de ceux-ci.

(57) L'invention se rapporte à la synthèse organique.

Elle concerne un procédé de préparation d'un acide lyso-
phosphatidique ou d'un sel de celui-ci a. par réaction, dans des
conditions anhydres, d'au moins un monoglycéride avec du
 POCl_3 dans un solvant inerte non miscible avec l'eau de
manière à former une solution d'un composé intermédiaire, b.
par hydrolyse de cet intermédiaire à l'aide d'une solution
basique diluée de façon à former une phase aqueuse et une
phase organique, c. par séparation de ces deux phases, et d. à
recueillir, par précipitation à partir de la phase aqueuse, l'acide
lysophosphatidique ou un sel de celui-ci.

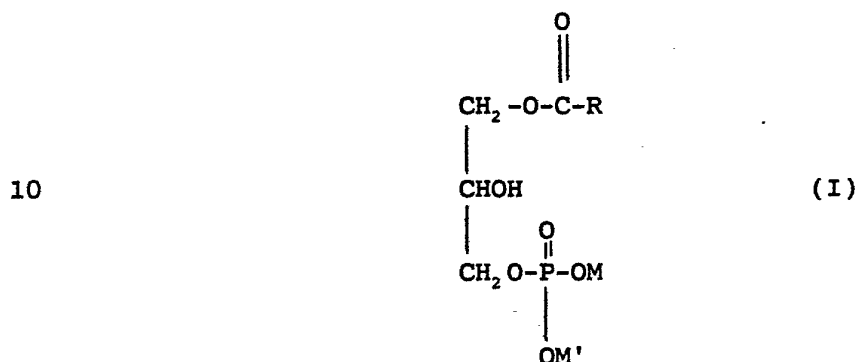
Applications comme émulsifiants, intermédiaires de syn-
thèse, etc.

FR 2 636 331 - A1

D

L'invention concerne un nouveau procédé de préparation d'acides lysophosphatidiques et de sels de ceux-ci.

Les acides lysophosphatidiques et leurs sels sont des composés connus ayant la formule générale I :



où R est un radical hydrocarbyle aliphatique et M et M' représentent, indépendamment, H ou un atome de métal monovalent ou, pris ensemble, un atome de métal divalent.

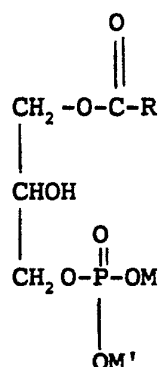
US-A-4 423 440 décrit un procédé de préparation de tels acides qui consiste à faire réagir dans un solvant organique approprié de l'acide phosphorique anhydre sur un ester de glycidyle. La synthèse est suivie d'une opération de purification par cristallisation. Les sels de métaux monovalents peuvent être obtenus par neutralisation du mélange réactionnel avec un hydroxyde de métal alcalin. Les sels de métaux polyvalents peuvent être obtenus par traitement d'une solution aqueuse d'un sel de métal monovalent avec un sel hydrosoluble du métal polyvalent.

Ce procédé nécessite de partir d'un ester de glycidyle que l'on doit préparer préalablement par l'un des procédés indiqués dans le brevet des E.U.A. précité. Il serait donc avantageux de disposer d'un procédé utilisant comme matière de départ un composé plus aisément disponible. La présente invention vise à fournir un tel procédé.

L'invention concerne un procédé de préparation d'un acide lysophosphatidique ou d'un sel de celui-ci ou d'un mélange de tels acides ou sels, répondant à la formule I :

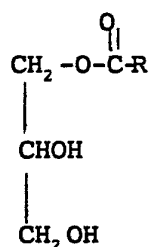
2

5



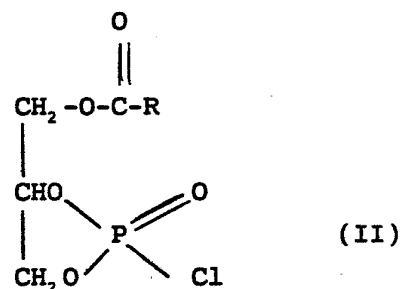
10 où R est un radical hydrocarboné aliphatique saturé ou
 insaturé de 8 à 22 atomes de carbone et M et M'
 représentent, indépendamment, H ou un atome de métal
 monovalent ou, pris ensemble, un atome de métal divalent,
 caractérisé en ce qu'il consiste (a) à faire réagir, dans
 15 des conditions anhydres, au moins un monoglycéride de
 formule

20



avec du POCl_3 dans un solvant inerte non-miscible avec
 l'eau de manière à former une solution d'un composé
 25 intermédiaire cyclique de formule II :

30



(b) à hydrolyser ce composé intermédiaire par une base en
 35 solution aqueuse diluée de façon à former une phase
 aqueuse contenant un sel de formule I où M et M'
 correspondent au métal de la base utilisée et une phase

organique,

- (c) à séparer la phase aqueuse de la phase organique, et
(d) à recueillir, par précipitation à partir de la phase aqueuse, ledit sel de formule I ou l'acide
5 lysophosphatidique correspondant.

Etape (a) (phosphorylation) : l'opération doit être réalisée en conditions anhydres, autrement POCl_3 s'hydrolyse facilement en acide phosphorique et acide chlorhydrique. On choisira donc des solvants et des
10 réactifs anhydres.

On peut pratiquer la phosphorylation sur tous les types de monoglycérides, quelle que soit la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras et quel que soit son état de saturation ; en effet POCl_3 ne réagit pas avec les
15 doubles liaisons des acides gras insaturés et on peut donc phosphoryler des monoglycérides insaturés.

Des exemples de chaînes grasses entrant dans la composition de monoglycérides sont notamment les suivants : acide palmitique (16:0), acide stéarique (18:0), acide
20 oléique (18:1, cis - 9), acide linoléique (18:2, cis 9, 12), acide gamma-linolénique (18:3, cis 6, 9, 12).

Les monoglycérides sont disponibles commercialement. Certains sont des additifs alimentaires (émulsifiants).

Ils sont tout d'abord dissous dans un solvant
25 organique anhydre. Le solvant, pour les besoins de l'invention, ne doit pas comporter de fonctions hydroxyle (OH) car celles-ci seraient phosphorylées préférentiellement par POCl_3 ; il doit, avec l'eau, former un système bi-phasique et, donc être non miscible à l'eau.

30 On peut citer, à titre d'exemples non limitatifs, le dichlorométhane, l'hexane, l'acétate d'éthyle. Après dissolution du monoglycéride dans le solvant ou pendant la dissolution, on ajoute de préférence, mais non obligatoirement, un composé susceptible de piéger les
35 protons qui se forment pendant la réaction de phosphorylation. Cette précaution permet d'augmenter les rendements de la réaction. Comme piège à protons

(accepteur d'acide), on peut citer, entre autres, la triéthylamine . Le rapport molaire du composé qui piège les protons au monoglycéride peut varier de 1 à 3 environ. A ce milieu réactionnel, on ajoute ensuite POCl_3 , par
5 petites portions et en refroidissant le milieu réactionnel dans de la glace (ces opérations ne sont que des précautions opératoires). Le rapport molaire POCl_3 /monoglycéride est de l'ordre de 1 à 1,25 environ, de préférence de 1 à 1,1. La préparation est ensuite portée à
10 une température qui peut aller de la température ambiante à la température de reflux du solvant, de préférence de 40°C à 50°C pendant 1 à 2 heures environ. La réaction sera d'autant plus rapide que la température est élevée.

Pendant la réaction, on maintient une atmosphère
15 anhydre au-dessus du milieu réactionnel par balayage à l'aide d'un gaz inerte et sec (Azote ou Argon par exemple).

Pendant les réactions, il se forme du chlorhydrate de triéthylamine (si on a ajouté de la triéthylamine) qui
20 est insoluble en milieu organique et qui précipite.

A la fin de la réaction, le chlorhydrate de triéthylamine est filtré (papier filtre ou verre fritté) et on récupère le filtrat qui contient l'intermédiaire cyclique de formule II.

25 Il n'est plus nécessaire, après phosphorylation, de maintenir des conditions anhydres.

Etape (b) (hydrolyse) : elle est effectuée par addition à la phase organique contenant l'intermédiaire cyclique (filtrat) d'une solution aqueuse de base. On forme un
30 système biphasique que l'on maintient agité. On peut utiliser pour cela une base minérale ou organique : soude, potasse, ammoniac, carbonate de sodium ou de calcium, acétate de sodium, par exemple. Cependant, selon la base utilisée, le sel de l'acide lysophosphatidique obtenu
35 sera différent. Avec la soude, on obtiendra le sel de sodium, avec la potasse, le sel de potassium, etc...

Le rapport molaire de la base à l'intermédiaire (ou

au monoglycéride) est de l'ordre de 2 à 4 environ et on utilisera des solutions diluées dont le titre est par exemple de l'ordre de 0,05 N à 0,5 N, de préférence de 0,1 N à 0,2N. Si des solutions de base trop concentrées
5 sont utilisées, on peut assister à la saponification de l'intermédiaire.

L'hydrolyse basique de l'intermédiaire cyclique s'effectue en quelques heures à température ambiante (1 heure à 8 heures environ).

- 10 Etape (c) (séparation de phases) : lorsque l'hydrolyse est terminée, on laisse reposer la préparation afin de faire apparaître les deux phases (par exemple, dans une ampoule à décanter).

On sépare les deux phases et on récupère la phase
15 aqueuse qui contient le sel de l'acide lysophosphatidique hydrosoluble.

Cette phase contient également tous les composés hydrosolubles du milieu réactionnel et il est nécessaire de pratiquer une opération de purification de l'acide
20 lysophosphatidique.

Etape (d) (recueil et purification) : cette opération peut être réalisée en insolubilisant le composé à récupérer. On peut procéder, par exemple, de deux façons.

(i) Ajout d'un solvant organique qui est miscible à
25 l'eau et un non solvant pour le sel, à la phase aqueuse : on peut utiliser pour cela, des solvants tels que, par exemple, l'acétone, l'éthanol ou le méthanol. Habituellement, on ajoute un demi-volume à un volume de solvant par rapport à la phase aqueuse. Le sel de l'acide
30 lysophosphatidique précipite et on le récupère par filtration (papier au verre fritté). Si l'analyse montre que la pureté n'est pas suffisante, on peut laver le précipité à l'aide du solvant correspondant et/ou redissoudre le précipité dans l'eau et le re-cristalliser
35 toujours à l'aide du même solvant.

(ii) Passage sous forme protonée : cette forme est insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants

organiques ou bien dans les huiles. On acidifie la phase aqueuse jusqu'à obtention d'un précipité que l'on filtre.

Pour cela on peut utiliser n'importe quel acide minéral ou organique (chlorhydrique, phosphorique, 5 sulfurique, acétique, etc...). Typiquement, on ajoutera l'acide en une proportion telle qu'on obtienne un pH dans la gamme de 3 à 5 environ. Il faut éviter un pH trop acide qui risquerait d'hydrolyser le produit final désiré.

Les produits purs obtenus sont ensuite séchés. On 10 peut, par exemple, effectuer cette opération à température ambiante sous vide.

Il est à noter qu'il serait également possible d'obtenir le monosel de l'acide lysophosphatidique (M = métal et M' = H) en acidifiant légèrement la phase aqueuse 15 après l'étape (c), puis en effectuant l'étape d(1).

Les exemples non limitatifs suivants sont donnés en vue d'illustrer le procédé de l'invention.

EXEMPLE 1 - Phosphorylation d'un mélange de monoglycérides -

20 Source de monoglycérides : mélange commercial à 90% environ de monoglycérides contenant 28% de monopalmitine et 64% de monostéarine. Ce produit est fabriqué et vendu par la Firme GRINSTED sous l'appellation DIMODAN PM;

On mélange, dans des conditions anhydres, sous azote 25 séché par passage à travers un tube contenant du chlorure de calcium, 2,5 g (0,007 mole) de Dimodan PM et 1,7 g (0,0168 mole) de triéthylamine dans 30 ml de dichlorométhane et on laisse dissoudre.

On ajoute, goutte-à-goutte et sous agitation, 0,64 g 30 (0,007 mole) de POCl_3 , puis on chauffe à reflux du solvant pendant deux heures.

Après cela, on filtre sur papier le chlorhydrate de triéthylamine formé et on récupère le filtrat.

On ajoute au filtrat 140 ml d'une solution aqueuse 35 0,2 N de potasse et on laisse sous agitation à température ambiante pendant 8 heures.

Les deux phases sont ensuite séparées à l'aide d'une

ampoule à décanter et on récupère la phase aqueuse à laquelle on ajoute 140 ml d'acétone. Il se forme un précipité blanc que l'on récupère par filtration sur papier. Le précipité est lavé à l'acétone puis redissous
5 dans 150 ml d'eau déminéralisée. On ajoute 100 ml d'acétone et on récupère, par filtration sur papier, le précipité qui se forme. Celui-ci est lavé à l'acétone puis séché sous vide.

Le produit sec obtenu analysé par RMN du phosphore
10 et par spectrométrie de masse est un mélange de deux acides lysophosphatidiques (où R est en C_{15} et C_{17}) correspondant aux deux monoglycérides de départ. Ils se présentent sous la forme du sel double de potassium. La préparation a une pureté de plus de 95%. Le rendement de
15 l'opération est de l'ordre de 75%.

EXEMPLE 2 -

Source de monoglycérides : mélange commercial à 90% minimum de monoglycérides insaturés d'origine végétale. Ce produit est fabriqué et vendu par GRINSTED sous
20 l'appellation DIMODAN CP. Le processus de synthèse est identique à celui décrit dans l'exemple 1.

On obtient des acides lysophosphatidiques sous forme de sel double de potassium avec une pureté de plus de 95%.

EXEMPLE 3 - Utilisation d'hexane comme solvant organique
25 de la synthèse -

On mélange, sous un courant d'azote sec, 10 g de Dimodan PM et 6 g de triéthylamine dans 250 ml d'hexane puis on porte le mélange à reflux du solvant pour dissolution complète.

30 La préparation est ensuite refroidie dans de la glace et on ajoute goutte-à-goutte 2,5 g de $POCl_3$ en agitant.

Le milieu réactionnel est ensuite porté 2 heures à 45°C sous agitation. On filtre le chlorhydrate de
35 triéthylamine formé puis on récupère le filtrat auquel on ajoute 500 ml d'une solution 0,2 N de potasse dans l'eau. Le mélange est agité 8 heures à température ambiante puis

les deux phases sont séparées.

A la phase aqueuse, on ajoute 500 ml d'acétone et on récupère le précipité formé par filtration sur papier.

Le produit récupéré a les mêmes caractéristiques analytiques que celui fabriqué selon l'exemple 1.

EXEMPLE 4 - Effet de la température de synthèse -

On répète le mode opératoire de l'exemple 1 mais au lieu de porter le solvant (dichlorométhane) à reflux, on laisse la préparation à température ambiante (20°C) pendant 10 heures sous agitation.

Toutes les autres opérations du mode opératoire sont identiques à celles de l'exemple 1.

Les caractéristiques analytiques du produit obtenu sont les mêmes que pour le produit de l'exemple 1. Le rendement est de l'ordre de 55%.

EXEMPLE 5 - Hydrolyse à l'aide de soude -

On répète le mode opératoire décrit dans l'exemple 1, mais on remplace la potasse par de la soude 0,2 N. La même quantité est employée. Les caractéristiques et les rendements observés sont identiques mais le produit obtenu est le sel double de sodium des acides lysophosphatidiques.

EXEMPLE 6 - Effet du solvant de précipitation -

On répète le mode opératoire décrit dans l'exemple 1, mais on utilise 200 ml d'éthanol pour précipiter le produit.

Le rendement est de l'ordre de 70% et la pureté est supérieure à 95%.

EXEMPLE 7 - Récupération du produit par acidification -

On répète le mode opératoire décrit dans l'exemple 1 mais après récupération de la phase aqueuse, on ajoute 100 ml d'une solution normale aqueuse d'acide chlorhydrique.

Il se forme un précipité blanchâtre que l'on récupère par filtration et qu'on lave à l'eau déminéralisée.

Le produit est constitué à 90% par les acides

lysophosphatidiques où R est en C_{15} et C_{17} sous forme protonée. Le rendement est de l'ordre de 55%.

EXEMPLE 8 - Synthèse sans utilisation de piège à protons-

On mélange, dans des conditions anhydres, sous azote
5 séché par passage à travers un tube contenant du chlorure de calcium, 5 g de DIMODAN PM et 60 ml de dichlorométhane anhydre et on laisse dissoudre en portant le solvant à reflux.

Après refroidissement, on ajoute, goutte-à-goutte
10 et sous agitation, 1,4 ml de $POCl_3$, puis on chauffe à reflux du solvant pendant 2 heures.

On ajoute ensuite 280 ml d'une solution aqueuse de
potasse 0,2 N et on laisse sous agitation à température
ambiante pendant 6 heures. Les deux phases (aqueuse et
15 organique) sont ensuite séparées à l'aide d'une ampoule à décanter et on récupère la phase aqueuse à laquelle on ajoute 280 ml d'acétone. Le précipité qui se forme est filtré, lavé à l'acétone et séché sous vide.

Le rendement de l'opération est de l'ordre de 20%
20 et la pureté des acides lysophosphatidiques (sous la forme des sels doubles de potassium) est supérieure à 95%.

Les composés préparés par le procédé de l'invention sont utiles comme :

- Composé émulsifiant : sous forme de sel de cation
25 monovalent (sodium, potassium) c'est un émulsifiant hydrosoluble ;

sous forme de sel de cation
bivalent ou sous forme protonée, c'est un émulsifiant
liposoluble.

30 On peut envisager de l'adopter comme émulsifiant alimentaire ou cosmétique.

- Intermédiaire de synthèse pour la production de
phospholipides purifiés (phosphatidylcholine pure par
exemple).

35 - Agent bactériostatique ou bactéricide.

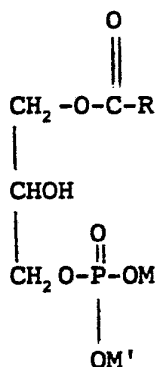
- Améliorant de panification.

REVENDICATIONS

1. Un procédé de préparation d'un acide lysophosphatidique ou d'un sel de celui-ci ou d'un mélange de tels acides ou sels, répondant à la formule I :

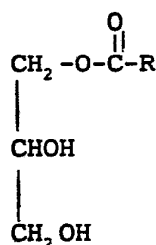
5

10



où R est un radical hydrocarboné aliphatique saturé ou insaturé de 8 à 22 atomes de carbone et M et M' représentent, indépendamment, H ou un atome de métal monovalent ou, pris ensemble, un atome de métal divalent, caractérisé en ce qu'il consiste (a) à faire réagir dans des conditions anhydres, au moins un monoglycéride de formule

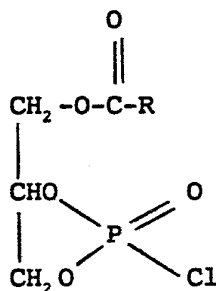
25



avec du POCl_3 dans un solvant inerte non-miscible avec l'eau de manière à former une solution d'un composé intermédiaire cyclique de formule II :

30

35



- (b) à hydrolyser ce composé intermédiaire par une base en solution aqueuse diluée de façon à former une phase aqueuse contenant un sel de formule I où M et M' correspondent au métal de la base utilisée et une phase
5 organique,
(c) à séparer la phase aqueuse de la phase organique, et
(d) à recueillir, par précipitation à partir de la phase aqueuse, ledit sel de formule I ou l'acide lysophosphatidique correspondant.
- 10 2. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en, ce que le rapport molaire POCl_3 /monoglycéride est compris dans la gamme allant de 1 à 1,25 environ.
3. Un procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit rapport molaire est compris dans la gamme
15 allant de 1 à 1,1 environ.
4. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'étape (a) est effectuée à une température comprise entre la température ambiante et la température de reflux du
20 solvant.
5. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la base utilisée dans l'étape (b) a une concentration comprise entre 0,05 et 0,5 N.
- 25 6. Un procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la concentration de la base est comprise entre 0,1 et 0,2 N environ.
7. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'étape (d)
30 comprend la précipitation du sel de la phase aqueuse par addition à celle-ci d'un solvant organique miscible avec l'eau et qui est un non solvant pour le sel.
8. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'étape (d)
35 comprend une acidification de la phase aqueuse en vue de précipiter l'acide lysophosphatidique correspondant au sel obtenu dans l'étape (b).

9. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'on effectue l'étape (a) en présence d'un piège à protons.

10. Un procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'on utilise de la triéthylamine comme piège à protons.