



BREVET DE INVENTIE

(12)

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **146135**

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(22) Data de depozit: **17.10.90**

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(30) Prioritate:

(86) Cerere internațională PCT:
Nr.

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(87) Publicare internațională:
Nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
31.03.94 BOPI nr. 3/94

(56) Documente din stadiul tehnicii:
C.A., vol.101 / 1984; P 73102; RO 73018

(45) Data publicării brevetului:
BOPI nr.

(71) Solicitant: **Institutul de Energetică Chimică și Biochimică, Timișoara, Filiala Timișoara, RO**

(73) Titular: (72)

(72) Inventatori: **Boeriu Carmen Gabriela, Kaycsa Adriana Doina, Peter Francisc, Preda Gabriela Maria, Eisler Sigrun Ruth, Deretey Eugen, Oana Diana Felicia, RO**

(54) Procedeu enzimatic, de separare a acidului D-(-)- α -aminofenilacetic din racemic

(57) Rezumat: Invenția se referă la un procedeu enzimatic de separare a acidului D-(-)- α -aminofenilacetic din racemic care cuprinde următoarele etape: - acetilarea acidului D,L- α -aminofenilacetic cu un exces de 20% moli anhidridă acetică în prezență de NaOH încât pH-ul să fie slab bazic, la temperatura de 5 ... 15°C, apoi acidulare cu HCl conc. până la pH = 1 ... 2 când precipită acidul N-acetil-D,L- α -aminofenilacetic, care se filtrează și se usucă; - hidroliza enzimatică a soluției apoase de acid N-acetil-D,L- α -aminofenilacetic 0,1 M și pH = 7 conținând 1×10^{-4} M CoCl₂, prin trecerea soluției printr-un bioreactor tip coloană cu aminoacilază fungică imobilizată pe un suport tip dextran modificat chimic cu o viteză spațială de 0,25 ... 0,35 h⁻¹, la 50°C, realizându-se o conversie în acid L-(+)- α -aminoacetic; - separarea acidului L-(+)- α -aminoacetic prin concentrarea soluțiilor obținute la ieșirea din coloană, în vid până la aproximativ 15 ... 20% din volumul inițial, precipitare prin răcire la 15°C, filtrare și uscare; - separarea acidului N-

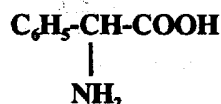
acetil-D-(-)- α -aminofenilacetic prin acidularea filtratului obținut cu HCl 5N până la pH = 1 ... 2, când precipită acetilderivatul care se filtrează și se usucă la temperaturi moderate; - dezacetilarea prin încălzirea suspensiei de 30 ... 35% masă de acid N-acetil-D-(-)- α -aminofenilacetic, în HCl 2,5N la reflux, timp de 3 ... 5h, răcire, corectarea pH-ului la 5,6 cu NaOH 5 N, menținerea suspensiei obținute la 4 ... 10°C timp de aproximativ 10 ... 14 h, urmată de filtrare și uscarea precipitatului la temperaturi moderate, obținându-se acidul D-(-)- α -aminofenilacetic; - racemizarea acidului L-(+)- α -aminofenilacetic de concentrație 5 ... 10% prin refluxare în soluție de NaOH 2 N timp de 1 ... 3h, răcire, ajustarea pH-ului la 5,6 cu HCl 5N, menținere aproximativ 10 ... 14 h la 4 ... 10°C, filtrare și uscare obținându-se acidul D,L- α -amofenilacetic, care se recirculă în proces la faza de acetilare.

Revendicări: 1

RO 108252 B1



Invenția se referă la un procedeu enzimatic, de separare a acidului D-(-)- α -aminofenilacetic, din racemic, destinat utilizării, ca intermediar în semisinteza unor peniciline



acid α -aminofenilacetic (fenilglicină)

În scopul separării celor doi izomeri optici, se cunosc mai multe metode ca: scindarea fizico-chimică, cu ajutorul unor baze optice active (cinconină, chinină) sau acizi optici activi (acidul D (+)-10-camfosulfonic sau acidul 3-brom-10-camfosulfonic) și separarea enzimatică. Procedeele fizico-chimice prezintă dezavantajul că necesită un consum ridicat de compus optic activ, materie primă costisitoare și greu accesibilă, o metodă laborioasă de recuperare a materiilor prime și au randamente scăzute.

Pe cale enzimatică, acidul D-(-)- α -aminofenil-acetic se poate obține prin hidroliza enzimatică, a amidei acidului D,L- α -aminofenilacetic, cu L- α -aminoacilamidază, (patent RFG nr.2700456)

Se cunoaște, de asemenea, un procedeu prin care se obține acidul D-(-)- α -aminofenilacetic, prin hidroliză asimetrică, catalizată de aminoacilază renală, imobilizată pe diferite suporturi insolubile (patent RPP nr.122795).

Aceste procedee enzimatic prezintă dezavantajul că folosesc enzime destul de greu accesibile, în cantități mari.

Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele menționate mai sus, prin aceea că cuprinde următoarele etape:

- acetilarea acidului D,L- α -aminofenilacetic;
- hidroliza enzimatică a acidului N-acetil-D,L- α -aminofenilacetic cu aminoacilază fungică, imobilizată;
- separarea acidului L-(+)- α -aminoacetic;
- separarea acidului N-acetil-D-(-)- α -aminoacetic ;
- dezacetilarea acidului N-acetil-D-(-)- α -aminofenilacetic;
- racemizarea acidului L-(+)- α -amino-

fenilacetic, în vederea reintroducerii în proces.

Prin aplicarea invenției, se obțin următoarele avantaje:

- nu necesită faze laborioase;
- utilizează materii prime accesibile;
- nu necesită utilizarea unor compuși optici activi scumpi;
- se realizează cu aport energetic, scăzut.

Comparativ cu procedeele enzimatic, prezentate, are avantajul că utilizează enzima de origine fungică, ușor accesibilă, utilizează, pentru imobilizare, o tehnică simplă, iar enzima imobilizată are stabilitate operațională, ridicată și poate fi ușor regenerată.

Se dă, în continuare, un exemplu de realizare a prezentei invenții.

Intr-un reactor de sticlă, prevăzut cu agitare și răcire, se suspendă 15 g (0,1 moli) acid α -aminofenilacetic racemic în 72 g (4 moli) apă. Suspensia obținută se răcește sub agitare, la 5°C și se introduce alternativ, în porțiuni mici, 12,16 g (0,12 moli) anhidridă acetică și 28,5 ml soluție NaOH 35% (0,25 moli NaOH) astfel, încât pH-ul mediului să fie bazic, iar temperatura amestecului să se mențină între 5 și 15°C. În timpul dăugării reactivilor, masa de reacție se fluidizează. Reacția durează 4 h. Apoi masa de reacție se acidulează, sub agitare, cu 39,5 ml HCl concentrat (0,4 moli HCl), până la pH=1-2, menținând temperatura sub 15°C, când precipită produsul de reacție, care se filtrează și se usucă la temperaturi moderate. Se obțin 17g (0,092 moli) acid N-acetil- α -aminofenilacetic racemic, produs pur (randament 85% față de fenilglicină).

În vederea obținerii acidului D-(-)- α -aminofenil-acetic, se hidrolizează enzimatic acetilderivatul obținut mai sus. Dintr-un rezervor de 2 l, soluția de acid N-acetil-D,L- α -aminofenilacetic de concentrație 0,1 M, pH 7,0, cu 1×10^{-4} M CoCl_2 , se trece cu ajutorul unei pompe dozatoare, peste coloana umplută cu aminoacilază pe DEAE-Filtradex R-50 (suport tip dexran modificat chimic), cu o activitate de 0,892 U/ml, fixată pe inele de sticlă, de dimensiuni 5 x 5 mm, termostatăată la 50°C. Coloana este exploatată continuu, la o viteză spațială de 0,308 h⁻¹, realizându-se, pentru catalizatorul cu activitatea dată, o capa-

citare catalitică a umpluturii de 78,2 U și o conversie în acid L-(+)- α -aminofenilacetic, mai mare de 95%. Pe măsură ce capacitatea catalitică a catalizatorului enzimatic scade, datorită inactivării acestuia, viteza spațială se reduce, menținându-se continuu conversia mai mare de 95%.

Soluțiile obținute la ieșirea din coloană, ce conțin 0,045 mol/l acid L-(+)- α -aminofenilacetic, 0,05 mol/l acid N-acetil-D-(-)- α -aminofenilacetic și 0,005 mol/l acid N-acetil-L-(+)- α -aminofenilacetic, se concentrează în vid, într-un evaporator rotativ, până la aproximativ 1/5 din volumul inițial. Soluția obținută se răcește la temperatura de 10°C, când precipită acidul L-(+)- α -aminofenilacetic. Suspensia se filtrează, iar precipitatul obținut se usucă, atunci când se obțin 12,6 g acid L-(+)- α -aminofenilacetic ($\eta_{\text{separare}} = 84\%$), de puritate 94,2%, cu rotația specifică ($c = 1$ HCl 1 N), $[\alpha]_D^{20} = 156,4^\circ$.

Filtratul separat (370 ml) se acidulează lent, sub agitare, cu HCl 5 N, până la pH 1 ... 2, când precipită acetilderivatul. Suspensia se mentine rece, câteva ore, se filtrează, iar precipitatul se usucă în etuvă. Se obțin 13,5 g acid N-acetil-D-(-)- α -aminofenilacetic, ($\eta_{\text{sep}} = 72,4\%$, de puritate 99,2% cu rotația specifică $[\alpha]_D^{20} = 216,8^\circ$, ($c = 0,5$, H₂O) și punct de topire 190 ... 192°C.

13,5 g acid N-acetil-D-(-)- α -aminofenilacetic (0,7 moli) se suspendă în 42 ml HCl 2,5 N (0,105 moli HCl) și se refluxează timp de 4 h, realizându-se hidroliza acidă a aminoacidului acilat. După răcire, soluția se aduce la pH 5,6 cu 20 ml soluție NaOH 5 N, când precipită acidul D-(-)- α -aminofenilacetic. Suspensia obținută se menține la rece, timp de aproximativ 12 h, pentru perfectarea precipitării, după care se filtrează, iar precipitatul se spală pe filtru, cu apă rece și alcool etilic. Precipitatul obținut se usucă în etuvă, la temperatură moderată, se caracterizează prin spectroscopie de IR, rotație optică specifică, iar puritatea se determină, prin titrare potențiometrică și metoda cu ninhidrină.

Se obțin 10,2 g (0,068 moli) acid D-(-)- α -aminofenilacetic ($\eta_{\text{sep}} = 97\%$), de puritate 98,2% cu o rotație specifică $[\alpha]_D^{20} = -154,6^\circ$ ($c = 1$, HCl 1N).

Acidul L-(+)- α -aminofenilacetic se

racemizează, în scopul reintroducerii lui în proces, la faza de acetilare și reducerii consumului de materie prime. Pentru aceasta, într-un balon prevăzut cu refrigerent de reflux, se introduc 31,5 g (0,208 moli) acid L-(+)- α -aminofenilacetic și 416 ml soluție NaOH 2 N (0,832 moli NaOH). Amestecul de reacție se refluxează, timp de 2 h, după care se răcește la temperatura camerei, se aduce la pH 5,6 cu HCl 5 N, când precipită acidul α -aminofenilacetic racemic. Suspensia se lasă aproximativ 12 h, la 4°C și se filtrează, iar precipitatul se spală pe filtru, cu apă rece. Precipitatul obținut se usucă. Se obțin 31 g (0,205 moli) acid α -aminofenilacetic racemic, ($\eta_{\text{sep}} = 98,4\%$), de puritate 92,6%, rotație specifică optică reziduală $+1^\circ$, ($c = 1$, HCl 1 N).

Revendicare

Procedeu enzimatic, de separare a acidului D-(-)- α -aminofenilacetic din racemic, caracterizat prin aceea că cuprinde următoarele faze:

- acetilarea acidului D,L- α -aminofenilacetic, cu un exces de 20% moli anhidridă acetică, în prezență de NaOH încât pH-ul să fie slab bazic, la temperatura de 5 ... 15°C, apoi acidulare cu HCl concentrație până la pH = 1 ... 2, când precipită acidul N-acetil-D,L- α -aminofenilacetic, care se filtrează și se usucă;

- hidroliza enzimatică a soluției apoase de acid N-acetil-D,L- α -aminofenilacetic 0,1 M și pH = 7 conținând 1×10^{-4} M CoCl₂, prin trecerea soluției printr-un bioreactor tip coloană cu aminoacilază fungică, imobilizată pe un suport tip dextran modificat chimic, cu o viteză spațială de 0,25 ... 0,35 h⁻¹, la 50°C, realizându-se o conversie în acid L-(+)- α -aminoacetic;

- separarea acidului L-(+)- α -aminoacetic, prin concentrarea soluțiilor obținute la ieșirea din coloană, în vid până la aproximativ 15 ... 20% din volumul inițial, precipitare prin răcire la 15°C, filtrare și uscare;

- separarea acidului N-acetil-D-(-)- α -aminoenilacetic prin acidularea filtratului obținut cu HCl 5 N până la pH 1 ... 2, când precipită acetilderivatul care se filtrează și se

5

usucă la temperaturi moderate;

- dezacetilarea, prin încălzirea suspensiei de 30 ... 35% masă de acid N-acetil-D-(-)- α -aminofenilacetic în HCl 2,5N la reflux, timp de 3 ... 5 h, răcire, corectarea pH-ului la 5,6 cu NaOH 5 N, menținerea suspensiei obținute, la 4 ... 10°C, timp de aproximativ 10 ... 14 h, urmată de filtrare și uscarea precipitatului la temperaturi moderate, obținându-se acidul D-(-)- α -aminofenilacetic; 10

6

- racemizarea acidului L-(+)- α -aminofenilacetic de concentrație 5 .. 10% prin refluxare în soluția de NaOH 2 N timp de 1 ... 3 h răcire, ajustarea pH-ului la 5,6 cu HCl 5 N, menținere aproximativ 10 ... 14 h la 4 ... 10°C, filtrare și uscare, obținându-se acidul D,L- α -aminofenilacetic, care se recirculă, în proces, la faza de acetilare.

Președintele comisiei de examinare: farm. Pentelescu Elena

Examinator: biochim. Crețu Adina

