



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101993900300480
Data Deposito	11/05/1993
Data Pubblicazione	11/11/1994

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	B		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	C		

Titolo

PROCEDIMENTO PER L'OTTENIMENTO DI GLICEROFOSFOLIPIDI
--

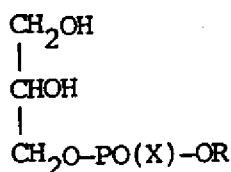
4059 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

GB/cp "PROCEDIMENTO PER L'OTTENIMENTO DI GLICEROFOSFOLIPIDI"

a nome: ITALFARMACO SUD S.p.A.

* * *

La presente invenzione si riferisce ad un nuovo procedimento per il frazionamento di glicerofosfolipidi deacilati di formula (I)

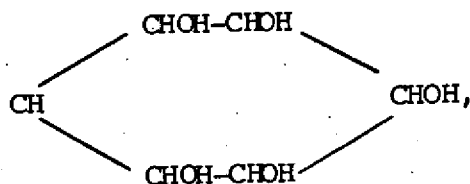


11 MAG. 1993

MI 93 A/00955

nella quale

R rappresenta una carica negativa, un atomo di idrogeno, un residuo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}^1\text{R}^2$ (dove R^1 e R^2 , uguali o diversi fra loro, rappresentano H o alchile C_1-C_4), un residuo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, un residuo $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ o un residuo



mentre

X rappresenta OH oppure O^- ,

a partire da miscele acquose o idroalcoliche, a due o più componenti, dei predetti glicerofosfolipidi deacilati e di eventuali impurezze di natura non glicerofosfolipidica.

Il procedimento è caratterizzato dal fatto che si sottopongono dette miscele a elettrodialisi in celle elettrolitiche a più scomparti, separati da membrane a scambio di cationi e/o da membrane a scambio di anioni, in condizioni di pH adatte a differenziare per la carica

positiva, negativa o neutra glicerofosfolipidi deacilati che si intendono separare tra di loro o rispetto ad altre impurezze di natura non glicerofosfolipidica.

Nella descrizione che segue si adotteranno per brevità le seguenti sigle:

- GPA per il composto di formula (I) in cui $R = H$ e $X = OH$;
- GPE per il composto di formula (I) in cui $R = CH_2CH_2NH_2$ e $X = OH$;
- GPC per il composto di formula (I) in cui $R = CH_2CH_2N^+(CH_3)_3$ e $X = O^-$;
- GPS per il composto di formula (I) in cui $R = CH_2CH(NH_2)COOH$ e $X = OH$;
- GPI per il composto di formula (I) in cui R è il residuo del mioinositolo e $X = OH$.

I composti di formula (I) possono essere di origine totalmente sintetica ovvero essere ricavati mediante reazione di deacilazione, secondo tecniche note, a partire da fosfolipidi acilati di origine vegetale (ad esempio da lecitina di soia) o di origine animale (ad esempio da rosso d'uovo o da cervello bovino). In entrambi i casi è possibile che nella miscela dei composti (I) da sottoporre ad elettrodialisi siano presenti impurezze di natura non glicerofosfolipidica, le quali possono essere rimosse durante il medesimo processo di frazionamento o successivamente secondo tecniche convenzionali, quali ad esempio la cristallizzazione, l'estrazione liquido/liquido, la cromatografia.

Il processo sorprendentemente permette un efficiente frazionamento dei composti di formula (I) utilizzando, rispetto ai procedimenti noti,

minori quantità di reagenti chimici o solventi, generando minori quantità di reflui da smaltire, permettendo l'ottenimento dei composti (I) con una maggiore produttività.

I composti di formula (I) sono caratterizzati dal fatto che a secondo del valore di pH della soluzione possono risultare carichi positivamente, negativamente o essere elettricamente neutri. Ad esempio, il composto GPC risulta sicuramente carico positivamente a valori di pH < 1 ca. e anfotero a valori di pH superiori a 4, mentre il composto GPE risulta carico positivamente a valori di pH < 1 ca., anfotero nell'intervallo di pH tra 5 e 8 ca. e carico negativamente a valori di pH > 10 ca. Analogamente è possibile trovare valori di pH della soluzione tali da differenziare grazie alla carica positiva, negativa o neutra le specie (I) presenti nella miscela. Utilizzando lo stesso principio è possibile separare i composti (I) da eventuali altre impurezze presenti nella miscela di partenza.

Pertanto, se si introduce una miscela di composti (I), in soluzione acquosa o idroalcolica, al pH opportuno, in uno scomparto della cella elettrolitica (definito d'ora in poi come scomparto A), delimitato da membrane a scambio di cationi e/o membrane a scambio di anioni, ed applicando un potenziale elettrico attraverso la cella, è possibile far migrare verso l'anodo le specie cariche negativamente attraverso la membrana a scambio di anioni (che ha cariche fisse positive e d'ora in avanti indicata come M^+) in uno scomparto adiacente (definito d'ora in poi come scomparto B), le specie cariche positivamente verso il catodo attraverso la membrana a scambio di cationi (che ha cariche fisse

negative e d'ora in avanti verrà indicata come M^-) in uno scomparto adiacente (definito d'ora in poi come scomparto C) e lasciando nello scomparto A le specie elettricamente neutre.

A secondo del tipo di miscela che si vuole frazionare è possibile effettuare la separazione lavorando in successione a differenti valori di pH.

Lo schema elementare della cella, formato da più scomparti, dipende dal tipo di miscela che si vuole separare; in ogni caso sono presenti gli elettrodi, catodo ed anodo, in prossimità dei quali si troveranno soluzioni elettrolitiche di sali e/o di acidi o basi inorganici, dette rispettivamente catolita e anolita, di composizione e concentrazione opportune compatibili con le necessità dei processi elettrochimici e di frazionamento. Negli scomparti A, B e/o C possono essere presenti fin dall'inizio o aggiunti successivamente dei sali inorganici per favorire la conducibilità, nel caso in cui non fosse sufficiente la presenza delle specie (I) cariche. La natura del catolita e dell'anolita è legata a quella di tali sali inorganici ovvero alla natura della miscela dei composti (I) presenti negli scomparti A, B e C. I sali, acidi o basi inorganici presenti nella cella sono dissociati in cationi ed anioni e possono a loro volta attraversare le membrane dotate di carica opposta ed essere respinti dalle membrane di pari carica competendo nel trasporto con le specie (I) cariche. Gli scomparti separati dalle membrane cationiche e/o anioniche sono in numero sufficiente per permettere l'introduzione della miscela di composti (I) e la raccolta delle specie frazionate; lo schema elementare può essere ripetuto in

serie per aumentare la produttività del processo collegando tra loro gli scomparti di uguale natura.

Ad esempio possono essere utilizzate celle di questa composizione:

- 1) (-)catodo/catolita/ M^- /scomparto A/ M^+ /scomparto B/ M^- /anolita/anodo(+)
- 2) (-)catodo/catolita/ M^+ /scomparto C/ M^- /scomparto A/ M^+ /anolita/anodo(+)
- 3) (-)catodo/catolita/ M^+ /scomparto C/ M^- /scomparto A/ M^+ /scomparto B/ M^- /anolita/anodo (+)
- 4) (-)catodo/catolita/ M^+ /scomparto A/ M^+ /scomparto B/ M^- /anolita/anodo(+)

Per semplicità sono stati schematizzati gli elementi caratterizzanti di questi possibili schemi di cella e non sono stati indicate le entrate da e le uscite verso l'esterno della cella.

Le celle 1 e 2 si prestano alla realizzazione di una catasta con due scomparti, delimitati da membrane di segno opposto come unità ripetitiva. La cella 3 si presta alla realizzazione di una catasta con tre scomparti, delimitati da membrane di segno opposto. La cella 4 si presta alla realizzazione di una catasta più complessa a causa della disposizione delle membrane, ma offre il vantaggio di garantire una adeguata conducibilità della corrente anche quando le specie (I) cariche negativamente si sono trasferite quasi completamente dallo scomparto A allo scomparto B.

Il processo è caratterizzato dalle seguenti reazioni elettrodiche:

al catodo $H^+ + e^- \rightarrow 1/2 H_2$

all'anodo $1/2 H_2O \rightarrow 1/4 O_2 + H^+ + e^-$

Di conseguenza, possono essere installati gli elettrodi convenzionalmente usati nelle celle elettrolitiche. Sono altresì possibili celle

ancora più semplici ad un'unica membrana (M^+ o M^-); in questo caso la miscela iniziale e la specie (I) frazionata risultano a diretto contatto con gli elettrodi. Le condizioni di frazionamento devono essere pertanto tali che le specie coinvolte siano stabili alle reazioni elettrodiche, cioè allo sviluppo di idrogeno e di ossigeno. Le membrane che possono essere usate in questo procedimento sono:

MC 3470 (scambiatrice di cationi)

e

MA 3475 (scambiatrice di anioni)

[Fornitore CYBRON CHEM INC. (G.B.)]

oppure

CMW SELEMION (scambiatrice di cationi)

AMR SELEMION (scambiatrice di anioni)

[Fornitore ASAHI GLASS CO. (J)]

oppure

CSP (scambiatrice di cationi)

ADP (scambiatrice di anioni)

[Fornitore MORGANE (F)].

Le membrane a scambio di cationi sono permeabili alle specie (I) cariche positivamente e ai cationi inorganici presenti; le membrane a scambio di anioni sono permeabili alle specie (I) cariche negativamente e agli anioni inorganici presenti. Entrambi i tipi di membrane hanno buona resistenza ai valori di pH di esercizio oltre che resistenza meccanica e termica, hanno bassa tendenza all'intasamento e possono essere riutilizzate dopo eventuali lavaggi con acqua, con una soluzione

idroalcolica, con una soluzione acida diluita, con una soluzione basica diluita, ancora con acqua o con una soluzione acquosa salina secondo metodica convenzionale.

La concentrazione iniziale di sali inorganici negli scomparti è compresa tra 0 e 5M per ottenere la miglior densità di corrente; il processo può essere condotto ad una densità di corrente tra 20 e 3000 A/m², riferita alla superficie di ciascuna membrana installata.

I seguenti esempi servono a meglio illustrare l'oggetto della presente invenzione senza limitarla in alcun modo, potendo l'esperienza del tecnico del ramo individuare facilmente le condizioni adatte per effettuare analoghe separazioni di miscele di composti (I), basandosi sui principi descritti.

Esempio 1

In una cella elettrochimica di composizione 4)

(-) M⁺ M⁻ M⁻ (+)

—| catolita| scomparto A| scomparto B| anolita|—

con elettrodi di platino, fornita di membrane MA 3475 (M⁺) e MC 3470 (M⁻), utilizzando come catolita KOH (concentrazione iniziale 0,05 M) e come anolita K₂SO₄ (concentrazione iniziale 0,66 M) sono stati introdotti nello scomparto A una soluzione acquosa di GPE/GPC di composizione 50% / 50% di purezza globale 99,6% e di concentrazione 0,1 M in entrambe le specie (I), ad un pH di 9,75 ottenuto per aggiunta di NaOH, nello scomparto B una soluzione acquosa di sodio acetato e di acido acetico entrambi 0,1 M.

L'elettrolisi è stata condotta a 3 A corrispondenti a 300 A/metro

quadro di superficie esposta nelle membrane. Dopo 40.000 coulomb lo scomparto A conteneva una miscela di GPE/GPC di composizione 3,5%/96,5% a pH circa 13.

Lo scomparto B conteneva al termine GPE, esente da GPC, ad un pH circa 13.

Il recupero di GPC e di GPE al termine della elettrodialisi risultava > 80%.

Ripetendo l'esempio 1, ma interrompendo l'elettrodialisi dopo l'utilizzo di 20.000 coulomb la composizione dello scomparto A risultava GPE/GPC 7%/93% mentre nello scomparto B la GPE risultava esente da GPC.

Esempio 2

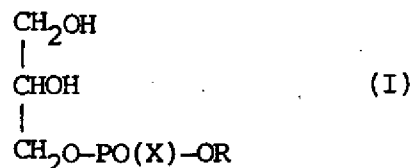
In una cella elettrochimica analoga a quella impiegata nell'esempio 1 sono stati introdotti nello scomparto A una miscela acquosa di GPE/GPC 47,6%/52,4% di purezza globale 90%, e di concentrazione totale 0,14 M delle specie (I) presenti, ottenuta mediante reazione di deacilazione di lecitina di soja deoleata (fornitore Solvay Duphar) e successivo passaggio su silice secondo modalità di letteratura, e nello scomparto B una soluzione acquosa di KCl 0,05 M.

L'elettrodialisi è stata condotta a 0,5 A corrispondenti a 50 A/metro quadro di superficie esposta dalle membrane e utilizzando un totale di 8.800 coulomb. Lo scomparto A conteneva alla fine una miscela di GPE/GPC 25%/75% a pH 12,5. Il recupero di GPC e di GPE al termine dell'elettrodialisi risultava > 90%.

Lo scomparto B conteneva una soluzione acquosa di GPE, esente da GPC a pH 12,5.

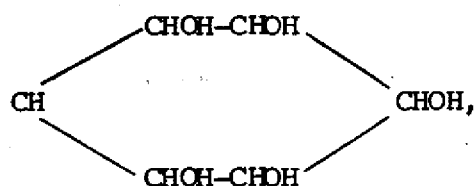
RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per il frazionamento di glicerofosfolipidi deacilati di formula (I)



nella quale

R rappresenta una carica negativa, un atomo di idrogeno, un residuo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}^1\text{R}^2$ (dove R^1 e R^2 , uguali o diversi fra loro, rappresentano H o alchile $\text{C}_1\text{-C}_4$), un residuo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, un residuo $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ o un residuo



mentre

X rappresenta OH oppure O^- ,

a partire da miscele acquose o idroalcoliche, a due o più componenti, dei predetti glicerofosfolipidi deacilati e di eventuali impurezze di natura non glicerofosfolipidica, caratterizzato dal fatto che si sottopongono dette miscele a elettrodialisi in celle elettrolitiche a più scomparti, separati da membrane a scambio di cationi e/o da membrane a scambio di anioni, in condizioni di pH adatte a differenziare per la carica positiva, negativa o neutra glicerofosfolipidi deacilati che si intendono separare tra di loro o rispetto ad altre impurezze di natura non glicerofosfolipidica.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1 di frazionamento di una

miscela contenente GPC e GPE caratterizzato dal fatto che si opera a pH > 8,5.

3. Procedimento secondo le precedenti rivendicazioni caratterizzato dal fatto che le soluzioni a contatto con gli elettrodi contengono sali e/o acidi o basi inorganici.

4. Procedimento secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni caratterizzato dal fatto che negli scomparti contenenti le miscele da separare si introducono, allo scopo di favorire la conducibilità, sali inorganici preferibilmente in concentrazioni comprese fra 0 e 5 M.

5. Procedimento secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni caratterizzato dal fatto che si opera con densità di corrente comprese tra 20 e 3.000 A/ metro quadro riferiti alla superficie di ciascuna membrana.

6. Procedimento secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni caratterizzato dal fatto che lo schema elementare della cella può essere ripetuto in serie.

Milano, 11 maggio 1993

Il Mandatario
(Bianchetti Giuseppe)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

G. Bianchetti

