

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

48 285

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono 24. I. 1963 (P 100 568)

Pierwszeństwo _____

Opublikowano: 1 1 SIERP. 1965

Kl. 12 o 6

MKP C. 086 19/08

UKD

Współtwórcy wynalazku: mgr inż. Jan Zbigniew Mioduszeński,
mgr inż. Mieczysława Mioduszeńska

Właściciel patentu: Instytut Farmaceutyczny, Warszawa (Polska)



Sposób wytwarzania dekstranu hydrolizowanego o założonej z góry lepkości istotnej lub wewnętrznej

1

Dekstran hydrolizowany stosowany jest do otrzymywania roztworów służących jako zamiastka plazmy krwi, do otrzymywania połączeń kompleksowych z żelazem stosowanych w lecznictwie, oraz do otrzymywania usieciowanych polimerów mających zastosowanie w chromatograficznym postępowaniu rozdzielczym. Dla wszystkich tych zastosowań konieczne jest aby otrzymywany dekstran miał możliwie ściśle unormowane właściwości fizykochemiczne, a w pierwszym rzędzie średni ciężar cząsteczkowy. Ta ostatnia cecha charakteryzowana jest często pośrednio przez oznaczanie lepkości istotnej lub wewnętrznej, jako wartości łatwiej dostępnych eksperymentalnie.

Znane są sposoby uzyskania dekstranu o zmniejszonej lepkości na drodze hydrolizy wysokocząsteczkowego dekstranu pochodzącego z biosyntezy prowadzonej za pomocą mikroorganizmów z rodzaju *Leuconostoc mesenteroides*. Hydrolizę prowadzi się w roztworach wodnych, w podwyższonej temperaturze, wobec kwasów mineralnych lub alkaliów. Na przebieg hydrolizy wpływ ma szereg parametrów jak: właściwości surowca wyjściowego, a więc jego ciężar cząsteczkowy, polidispersja, rodzaj i stosunek związków glikozydowych, stężenie dekstranu w roztworze, temperatura, czas ogrzewania, stężenie kwasu lub zasady, sposób mieszania, obecne w roztworze zanieczyszczenia itd.

Nawet przy bardzo ścisłej kontroli i automatyzacji procesu nie wszystkie te parametry daje się zachować niezmiennie dla każdej partii przerabianej — zwłaszcza dotyczy to właściwości surowca. W rezultacie w wyniku hydrolizy otrzymuje się produkt o zmiennym składzie, z którego wyodrębnia się na drodze frakcjonowania wytrącania rozpuszczalnikami organicznymi, jak alkohole, aceton itp., część o pożądanej lepkości i ciężarze cząsteczkowym. Przy procesie hydrolizy dekstranu prowadzonym według znanych sposobów przeciętnie 50% produktu hydrolizy stanowią frakcje o niepożądanym lepkości, które odrzuca się w trakcie frakcjonowania.

2

Szereg autorów podejmowało próby opracowania kontrolowanego procesu hydrolizy dekstranu. I. A. Wolff i współpracownicy, *Ind. Eng. Chem.* 46, 370, (1954) oraz 46, 2605 (1954) oznaczali w czasie hydrolizy lepkość względną roztworu, przerywając proces, gdy wartość lepkości zbliżała się do założonej. Sposób ten nie przyniósł jednak rozwiązania zagadnienia. Autorzy podają szereg wykresów przebiegu spadku lepkości w czasie hydrolizy. Są to krzywe, bardzo strome w początkowej fazie hydrolizy, a przebiegające tym łagodniej pod koniec hydrolizy im wolniej prowadzony jest proces. Aby mieć możliwość przybliżonej ekstrapolacji takiej krzywej w ostatnim momencie należy proces prowadzić przy niskim stężeniu kwasu lub przy niskiej temperaturze — w przeciwnym przypadku zabraknie czasu na wyko-

15
20
25
30

nywanie koniecznych częstych oznaczeń lepkości. Metoda kontroli narzuca konieczność stosowania mało korzystnych dla wydajności parametrów. Cytowani autorzy podają jako maksymalną wydajność końcową produktu około 40%, a po wprowadzeniu poprawki uwzględniającej możliwość wykorzystania części odpadów przy następnej hydrolizie około 50%. Podobne trudności wystąpiły przy zastosowaniu dla kontroli procesu lepkości kinematycznej roztworu, co referuje G. H. Bixler, Ind. Eng. Chem. 45, 692, (1953). Według tego autora hydroliza prowadzona jest w ciągu wielu godzin, a w końcowej jej fazie oznaczenia wykonywane są co 5 minut. W obu sposobach, ażeby wyniki dla poszczególnych szarż były porównywalne, konieczne jest zachowanie stałego stężenia dla każdej z nich, np. według Wolffa z tolerancją $\pm 0,05\%$, gdyż lepkość względna lub kinematyczna jest cechą roztworu zależną od stężenia.

Szereg autorów uważa nadal, że hydroliza dekstranu w skali przemysłowej nie daje się sterować. Behrens i Ringpfel podają w opisie patentowym nr 45228 na str. 2 wiersz 10 „...nie dający się sterować, a tym samym deficytowy przebieg hydrolizy...”

Sposób według wynalazku, pozwala na osiągnięcie wydajności produktu końcowego rzędu 70—82%, przy odchyleniach w wartości lepkości istotnej hydrolizatu w granicach $\pm 0,01$ (średnio $\pm 0,006$) jednostki w stosunku do wartości założonej dla danej szarży. Sposób ten nie ogranicza zakresu parametrów, może być stosowany zarówno przy procesie trwającym kilkanaście godzin, jak i przy bardziej korzystnych warunkach, a nawet w procesie zachodzącym w czasie poniżej 60 minut. Nie jest konieczne także zachowanie niezmiennego stężenia dla wszystkich szarż, może ono wynosić zarówno np. 5% jak i 20%. Sposób według wynalazku pozwala także na otrzymywanie w skali przemysłowej dekstranu niskocząsteczkowego, o ciężarze cząsteczkowym rzędu 2500—4000 i lepkościach istotnych rzędu 0,050—0,065, przy czym uzyskuje się wyniki różniące się od założonych w granicach $\pm 0,003$.

Według wynalazku jako wartość kontrolowaną w czasie hydrolizy przyjęto lepkość istotną lub wewnętrzną. Funkcje te dają wartości liczbowe prawie równe. Lepkość istotna zdefiniowana jest wzorem:

$$\left\{ \eta \right\} = \frac{2,303 \cdot \log \frac{t_1}{t_0}}{c}$$

w którym t_1 = czas wypływu w wiskozymetrze roztworu dekstranu przy rozcieńczeniu do stężenia około 1%

t_0 = czas wypływu wody destylowanej w tych samych warunkach i w tym samym wiskozymetrze

c = stężenie dekstranu w g/100 ml

Lepkość wewnętrzną zdefiniowaną jest wzorem:

$$\left[\eta \right] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{(\eta \text{ wzgl} - 1)}{c}$$

w którym η wzgl. = lepkość względna
 c = stężenie

Jak widać z wzorów, wartości te określają właściwość substancji rozpuszczonej, a nie samego roztworu.

Badając wartości lepkości istotnej dekstranu w różnych momentach w czasie procesu hydrolizy dekstranu stwierdzono, że w stałej temperaturze wartości te są funkcją czasu trwania hydrolizy, o wiele mniej złożoną i na wykresie bardziej zbliżoną do prostej niż wartość innych funkcji lepkości, np. lepkości względnej lub kinematycznej. Dalej stwierdzono, że przy wyrażaniu zależności wartości lepkości istotnej (lub wewnętrznej) od czasu trwania procesu w układzie współrzędnych log/log, zależność ta przedstawia linię prostą, w zakresie praktycznie stosowanych do hydrolizy dekstranu parametrów.

Spostrzeżenia te stanowią podstawę prowadzenia procesu hydrolizy dekadacji dekstranu w sposób kontrolowany, w którym trudne do ustabilizowania w skali przemysłowej parametry zmienne (jak właściwości surowca, różnice w ustawieniu stężenia), kompensowane są przez zmienny dla każdej szarży parametr czasu trwania hydrolizy. Przy założonej, pożądanej lepkości istotnej hydrolizatu, czas trwania procesu wyznacza się w czasie jego biegu przez wykonanie kilku (co najmniej dwóch) oznaczeń lepkości istotnej, w różnym czasie od początku hydrolizy — w tej fazie hydrolizy, gdy nie zachodzi obawa, że wynik oznaczenia będzie spóźniony. Następnie wyniki oznaczeń nanosi się na wykres, w którym w układzie podwójnej siatki logarytmicznej współrzędnymi są lepkości istotne i czas od momentu rozpoczęcia hydrolizy. Przez wyznaczone pomiarami, jak wyżej, punkty prowadzi się prostą przedłużając ją do przecięcia z prostą równoległą do osi czasu wyrażającą pożądaną lepkość końcową. Punkt przecięcia rzutowany na oś czasu daje dokładny czas, w którym należy przerwać proces.

Szczegóły praktycznego stosowania wynalazku wynikają z przytoczonych niżej przykładów. Przykłady te wykazują możliwość stosowania sposobu według wynalazku zarówno do hydrolizy dekstranu surowego otrzymanego przez fermentację jak i do hydrolizy wtórnej frakcji odpadkowych oraz do hydrolizy dekstranu na produkt niskocząsteczkowy.

Rysunki przedstawiają szereg krzywych lub prostych ilustrujących poszczególne przykłady.

Przykład I. Założona lepkość istotna hydrolizatu 0,250. 420 g surowego dekstranu wysokocząsteczkowego (otrzymanego na drodze biosyntezy za pomocą krajowego szczepu *Leuconostoc mesenteroides* „L”) o zawartości suchej substancji 147,2 g rozpuszczono w 2000 ml wody destylowanej, przy mieszaniu mechanicznym i ogrzewaniu w temperaturze 80—85°C. Otrzymano 2230 ml roztworu o stężeniu 6,6 g/100 ml. Temperaturę podwyższono do 90°C i utrzymywano przez czas reakcji z dokładnością $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Dodano 8 ml 4n HCl. Po 210, 300, 375 i 435 minutach mieszania i

ogrzewania pobierano próbki, które po szybkim schłodzeniu do temperatury 25°C rozcieńczano do stężenia 1,10 g/100 ml (stężenie kontrolowano polarymetrycznie) i z tak rozcieńczonych roztworów oznaczano czas wypływu w viskozymetrze kapilarnym Ubbelohde'go typ Oa. Odpowiednie wartości lepkości istotnej wyniosły dla kolejnych oznaczeń: 0,430, 0,336, 0,292, 0,264. Z ekstrapolacji wykreślnej na siatce log/log wynikało, że hydrolyzat osiągnie założoną lepkość istotną po 490 minutach reakcji. Dokładnie w tym czasie zobojętniono roztwór 4n NaOH do pH = 6,3, przy jednoczesnym chłodzeniu. Lepkość hydrolyzatu wynosiła 0,244. Po frakcjonowaniu etanolem i oczyszczaniu w sposób znany, otrzymano 125 g preparatu odpowiadającego wymogom dla dekstranu klinicznego. (Wydajność 84,9%).

Przykład ten ilustruje prosta 1 (fig. 1) na osiach $\log \{ \eta \}$ względem log. czasu.

Przykład II. Założona lepkość istotna produktu 0,230. Jako surowca użyto wysokocząsteczkowych frakcji dekstranu hydrolyzowanego uzyskiwanych jako produkt odpadkowy przy produkcji przemysłowej dekstranu klinicznego.

883 g syropowatego roztworu o zawartości 22,66% dekstranu rozcieńczono wodą destylowaną do objętości 2000 ml. Otrzymany 10% roztwór ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przy mieszaniu do temperatury 90°C, następnie utrzymywano tę temperaturę z dokładnością $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Dodano 6 ml 4n HCl. Po 130 i 190 minutach pobrano próbki, schłodzone i rozcieńczono do stężenia 1,00 g/100 ml. Oznaczono lepkości istotne jak w przykładzie I. Otrzymano wartości 0,284 i 0,248. Z ekstrapolacji wykreślnej wynikało, że hydrolyzat osiągnie założoną lepkość istotną po 230 minutach reakcji. Dokładnie w tym czasie roztwór zobojętniono 4n ługiem sodowym do wartości pH = 6,0 i schłodzone. Lepkość hydrolyzatu wynosiła 0,232.

Po frakcjonowaniu etanolem i oczyszczaniu w sposób znany, otrzymano 165 g preparatu o lepkości istotnej 0,220, odpowiadającego wymogom dla dekstranu klinicznego.

Przykład ten ilustruje prosta 2 (fig. 1) na osiach $\log \{ \eta \}$ względem log. czasu.

Przykład III. Założona lepkość istotna hydrolyzatu 0,052.

415 g dekstranu hydrolyzowanego, o średnim ciężarze cząsteczkowym M_w 47 300 i lepkości istotnej 0,210 rozpuszczono w wodzie destylowanej, uzupełniając roztwór do objętości 2000 ml. Otrzymany 20,7%-owy roztwór ogrzewano przy intensywnym mieszaniu mechanicznym pod chłodnicą zwrotną do temperatury $100^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$. W tej temperaturze dodano 50 ml 4n HCl i kontynuowano mieszanie i ogrzewanie. Po 15 minutach i 60 minutach hydrolyzy, pobrano próbki i oznaczono lepkości istotne w sposób opisany w poprzednich przykładach. Otrzymano odpowiednio wartości 0,117 i 0,061. Dla uzyskania hydrolyzatu o lepkości istotnej 0,052 wyznaczony wykreślne czas trwania hydrolyzy wynosił 83 minuty. Dokładnie w tym czasie rozpoczęto zobojętnianie ługiem sodowym i chłodzenie roztworu. Lepkość istotna hydrolyzatu wynosiła dokładnie 0,052.

Po frakcjonowaniu etanolem otrzymano 296 g frakcji właściwej o lepkości istotnej 0,055 nadającej się do otrzymywania połączeń kompleksowych z żelazem oraz 7 g frakcji o lepkości istotnej 0,061 i 19,5 g frakcji o lepkości istotnej 0,049.

Przykład ten ilustruje prosta 3 (fig. 2) na osiach $\log \{ \eta \}$ względem log. czasu.

W celu wykazania przebiegu zależności w osiach, lepkości istotnej względem czasu, wykreślono szereg punktów według prostej 3, jednakże w wartościach numerycznych. Otrzymano krzywą 4 (fig. 3), której ekstrapolacja byłaby znacznie trudniejsza i mniej dokładna.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania dekstranu hydrolyzowanego o założonej z góry lepkości istotnej lub wewnętrznej na drodze hydrolyzy dekstranu surowego pochodzącego z biosyntezy, lub też hydrolyzy już częściowo zdepolimeryzowanego dekstranu w roztworach wodnych w obecności kwasów mineralnych lub alkali, znamieny tym, że proces depolimeryzacji przerywa się w czasie wyznaczonym przez przecięcie prostej łączącej wyniki co najmniej dwóch oznaczeń lepkości istotnej przedstawionych na osiach współrzędnych wyrażających logarytm lepkości i logarytm czasu z prostą wyrażającą na tym wykresie założoną lepkość produktu hydrolyzy.

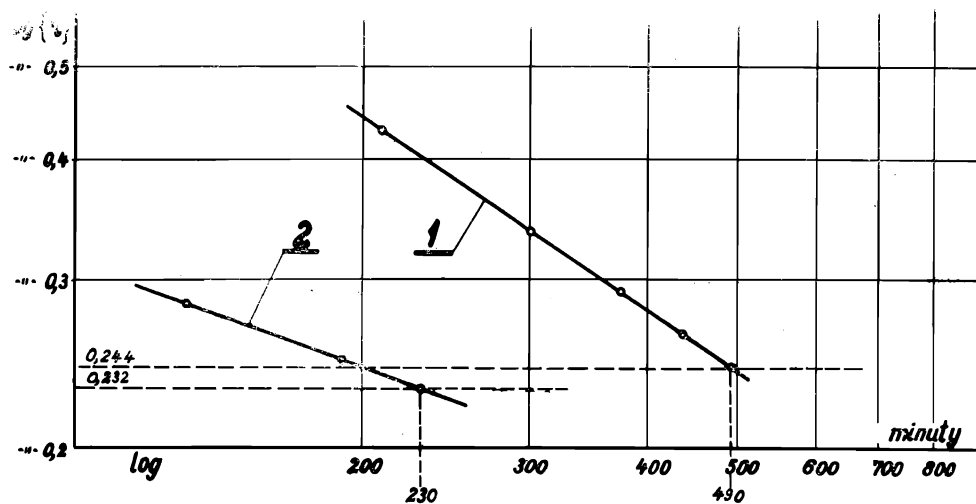


Fig. 1

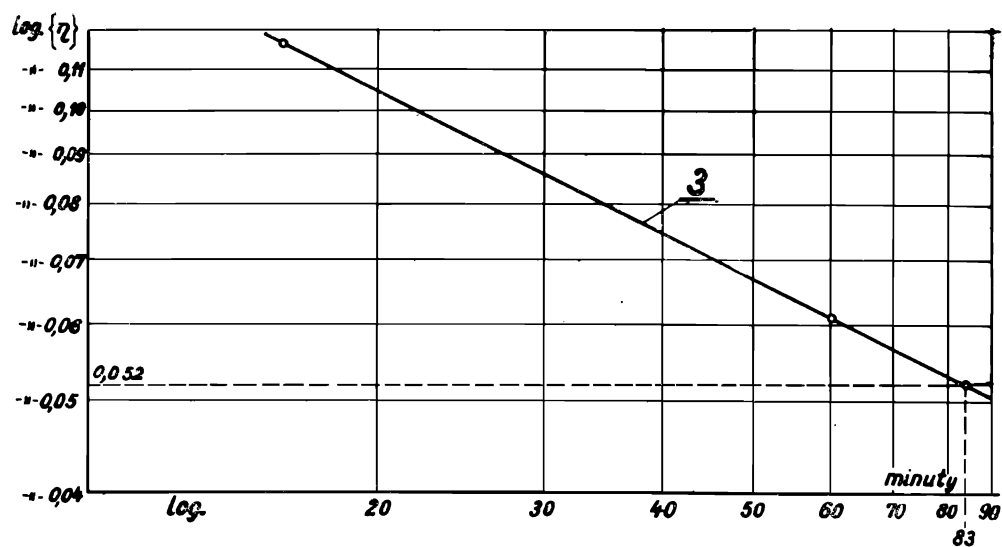


Fig. 2

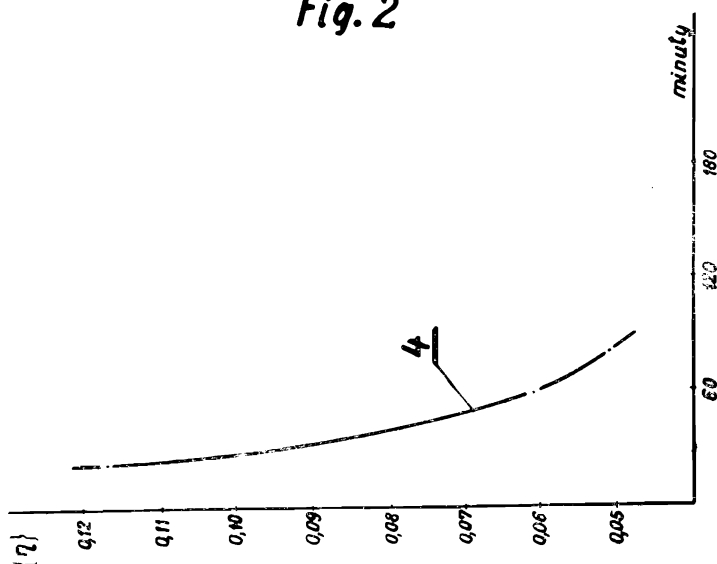


Fig. 3