

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIŚ PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **240031**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **431084**

(22) Data zgłoszenia: **09.09.2019**

(51) Int.Cl.

C07D 491/107 (2006.01)

C08B 37/08 (2006.01)

(54)

**Sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną
za pośrednictwem wiązania estrowego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

22.03.2021 BUP 06/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

07.02.2022 WUP 06/22

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ŁUKASZ LAMCH, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Meissner

PL 240031 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną za pośrednictwem wiązania estrowego.

Sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną za pośrednictwem wiązania estrowego pozwala na otrzymanie cennych polimerowych składników budulcowych, o pożądanych cechach aplikacyjnych dla zastosowań biomedycznych, prostą i selektywną metodą, prowadzącą do otrzymania związków z wysoką wydajnością. Związki te, zawierające znacznik fluorescencyjny (Rodaminę B), połączony z łańcuchem polimerowym wiązaniem estrowym, angażującym jedynie ugrupowania hydroksylowe chitozanu, mogą znaleźć zastosowanie w produktach farmaceutycznych i medycznych, m.in. jako składniki teranostycznych (łączyących funkcję diagnostyczną i terapeutyczną) nośników substancji biologicznie aktywnych. Ważną zaletą produktów uzyskanych według wynalazku jest pozostawienie w niezmienionej postaci ugrupowań aminowych chitozanu, co jest szczególnie ważne dla tzw. nośników inteligentnych, wykazujących responsywność wobec czynników zewnętrznych, np. zmian pH.

Z opisu zgłoszenia patentowego nr CN 105817208 znane są produkty usiecziowane chitozanu, zawierające przyłączoną chemicznie Rodaminę B, mogące być zastosowane jako adsorbenty. Proces przyłączenia Rodaminy B do chitozanu jest dwuetapowy: pierwszy etap polega na otrzymaniu hydrazynu Rodaminy B (reakcja z wodzianem hydrazyny), a drugi – na reakcji utworzonego półproduktu z chitozanem. Według opisu patentowego materiały te mogą być zastosowane do adsorpcji i detekcji jonów rtęci w wodzie. Wykorzystanie toksycznej hydrazyny wyklucza biomedyczne aplikacje utworzonych produktów.

Z opisu patentowego CN 10449674 znane są mikrokryształiczne znaczniki fluorescencyjne na bazie chitozanu z przyłączoną fluoresceiną, zdolne do chelatowania jonów metali. Proces przyłączenia fluoresceiny do chitozanu polega na powierzchniowej modyfikacji mikrokryształitów chitozanu izocyjanianem fluoresceiny. Według opisu patentowego materiały te mogą znaleźć zastosowanie jako znaczniki do wykrywania jonów metali. Struktura otrzymanych znaczników (modyfikacja powierzchniowa) znacznie utrudnia zastosowania biomedyczne, w których konieczne jest przeprowadzenie zmodyfikowanego chitozanu do postaci roztworu.

Znana z publikacji Chemistry Letters, 2000, 29, 596 (H. Sashiwa i inni, „Dissolution of Chitosan in Dimethyl Sulfoxide by Salt Formation”) metoda otrzymywania rozpuszczalnej w dimetylosulfotlenku soli p-toluenosulfonowej chitozanu polega na rozpuszczeniu równomolowych ilości kwasu p-toluenosulfonowego i chitozanu (w przeliczeniu na ugrupowania aminowe) w wodzie destylowanej i liofilizacji otrzymanego roztworu. Otrzymuje się sól p-toluenosulfonową chitozanu z wydajnością stechiometryczną. Uzyskany produkt (sól p-toluenosulfonowa chitozanu) jest całkowicie rozpuszczalny w dimetylosulfotlenku, w przeciwieństwie do czystego chitozanu.

Nie jest znany z literatury przedmiotu: sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną za pośrednictwem wiązania estrowego o wzorze ogólnym 1, będący przedmiotem wynalazku.

Istotą rozwiązania według wynalazku jest sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną za pośrednictwem wiązania estrowego o wzorze ogólnym 1, polegający tym, że proces przyłączenia rodaminy B prowadzi się w trzech etapach, z których pierwszy obejmuje otrzymanie soli p-toluenosulfonowej chitozanu, drugi – przyłączenie Rodaminy B do powstałej soli w warunkach Steglicha w środowisku bezwodnego dimetylosulfotlenku, a trzeci – usunięcie grup p-toluenosulfonowych z produktu, przy czym trzeci etap prowadzi się w warunkach dializy wobec 5% wodnego roztworu NaHCO_3 , a otrzymany surowy produkt izoluje się i oczyszcza się na drodze dializy wobec wody destylowanej i liofilizacji.

Korzystnie przyłączenie rodaminy B do soli p-toluenosulfonowej chitozanu prowadzi się w warunkach Steglicha w środowisku rozpuszczalnika organicznego, korzystnie bezwodnego dimetylosulfotlenku.

Korzystnie proces przyłączenia rodaminy B do soli p-toluenosulfonowej chitozanu prowadzi się przez 24 – 72 h, korzystnie około 48 h.

Korzystnie proces przyłączenia rodaminy B do soli p-toluenosulfonowej chitozanu prowadzi się w temperaturze pokojowej w obecności stechiometrycznych ilości dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) jako czynnika kondensującego oraz 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) jako katalizatora (1% mol w przeliczeniu na DCC).

Korzystnie proces zubożenia soli chitozanu z przyłączoną Rodaminą B prowadzi się w warunkach dializy wobec 5% wodnego roztworu NaHCO_3 .

Korzystnie proces zobojętnienia soli chitozanu z przyłączoną Rodaminą B prowadzi się przez około 12 – 36 h, korzystnie około 24 h.

Korzystnie oczyszczanie produktu prowadzi się na drodze dializy wobec wody destylowanej, zmieniając kilkakrotnie medium dializacyjne, a następnie izoluje się produkt poprzez liofilizację.

Zasadniczą zaletą sposobu według wynalazku jest wytwarzanie prostą metodą, z użyciem powszechnie dostępnych surowców, cennej pochodnej chitozanu, zawierającej znacznik fluorescencyjny – Rodaminę B – przyłączoną do grup hydroksylowych polimeru za pomocą wiązań estrowych. Otrzymany biokompatybilny i biodegradowalny składnik budulcowy może być wykorzystywany do otrzymywania nośników substancji biologicznie aktywnych, w tym przeznaczonych do jednoczesnej terapii i diagnostyki (tzw. teranostyki) oraz wykazujących responsywność wobec czynników zewnętrznych (zmiany pH).

Chitozan z Rodaminą B przyłączoną za pośrednictwem wiązania estrowego według wynalazku potencjalnie wykazują szereg interesujących własności użytkowych, z których najistotniejsza jest zawartość związanego z ugrupowaniami hydroksylowymi makrocząsteczki znacznika fluorescencyjnego, biokompatybilność i biodegradowalność, amfifilowa struktura, a także możliwość dalszej chemicznej / fizycznej modyfikacji, w tym ukierunkowanej na wybrane ugrupowania chemiczne (np.: aminowe). Może być wykorzystany jako składnik budulcowy nano- i mikrostruktur, m.in. nośników o znaczeniu farmaceutycznym lub nutraceutycznym, a także innych formułacji, w tym przeznaczonych do jednoczesnej terapii i diagnostyki (tzw. teranostyki). Sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną za pośrednictwem wiązania estrowego charakteryzuje się prostotą, łagodnymi warunkami syntezy (temperatura pokojowa, ciśnienie atmosferyczne) oraz możliwością otrzymywania produktów o różnym stopniu podstawienia Rodaminy B z dużymi wydajnościami. Z uwagi na pH-responsywność (możliwość przyjęcia / oddysocjowania protonu przy określonych wartościach pH) może stanowić składniki tzw. inteligentnych nośników substancji biologicznie aktywnych. Ważną cechą wynalazku jest pozostawienie w niezmienionej postaci ugrupowań aminowych chitozanu, przy jednoczesnej obecności Rodaminy B przyłączonej za pomocą wiązania estrowego do ugrupowań hydroksylowych. Cechy te umożliwiają wykorzystanie tych produktów do otrzymywania wysokospecjalistycznych, selektywnych nośników, wykorzystujących zjawiska responsywności wobec zmian środowiska.

Przedmiot wynalazku objaśniony jest na przykładzie otrzymywania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną za pośrednictwem wiązania estrowego o różnym stopniu podstawienia znacznikiem fluorescencyjnym (20, 5 i 1 merów chitozanu przypadający na cząsteczkę rodaminy B).

P r z y k ł a d I

W pierwszym etapie w celu otrzymania otrzymanie soli p-toluenosulfonowej chitozanu, przeznaczonego do reakcji syntezy chitozanu z Rodaminą B przyłączoną za pośrednictwem wiązania estrowego (1 mer chitozanu przypadający na cząsteczkę Rodaminy B), do zlewki wprowadza się 0,50 g chitozanu (średni stopień deacetylacji – 80%) i 0,50 g (0,0026 mola) kwasu p-toluenosulfonowego w postaci monohydratu, a następnie dodaje 100 cm³ wody destylowanej i miesza aż do uzyskania jednorodnej, lepkiej cieczy. Otrzymany roztwór poddaje się liofilizacji, uzyskując 1,00 g soli p-toluenosulfonowej chitozanu. W następnym etapie procesu uzyskaną sól p-toluenosulfonową chitozanu (1,00 g), 0,61 g (0,0029 mola) dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), 1,39 g (0,0029 mola) Rodaminy B i 0,01 g 4-dimetyloamino-pirydyny (DMAP) rozpuszcza się w 90 cm³ bezwodnego dimetylosulfotlenku. Następnie prowadzi się reakcję w zamkniętej, chronionej przed dostępem światła i wilgoci kolbie przez 72 h przy intensywnym mieszaniu. Kolejno mieszaninę reakcyjną filtruje się, rozcieńcza 90 cm³ wody destylowanej, umieszcza w worku dializacyjnym (MWCO 3500 Da) i dializuje przez 24 h wobec 5 dm³ 5% roztworu NaHCO₃. Następnie wymienia się medium dializacyjne na wodę destylowaną kontynuuje proces przez 120 h, zmieniając co 24 h medium dializacyjne. Następnie produkt izoluje się poprzez usunięcie wody na drodze liofilizacji, uzyskując 1,43 g produktu (około 66% wyd. teoretycznej).

P r z y k ł a d II

W pierwszym etapie w celu otrzymania otrzymanie soli p-toluenosulfonowej chitozanu, przeznaczonego do reakcji syntezy chitozanu z Rodaminą B przyłączoną za pośrednictwem wiązania estrowego (5 merów chitozanu przypadający na cząsteczkę Rodaminy B), do zlewki wprowadza się 0,50 g chitozanu (średni stopień deacetylacji – 80%) i 0,50 g (0,0026 mola) kwasu p-toluenosulfonowego w postaci monohydratu, a następnie dodaje 100 cm³ wody destylowanej i miesza aż do uzyskania jednorodnej, lepkiej cieczy. Otrzymany roztwór poddaje się liofilizacji, uzyskując 1,00 g soli p-toluenosulfonowej chitozanu. W następnym etapie procesu uzyskaną sól p-toluenosulfonową chitozanu (1,00 g), 0,12 g

(0,0006 mola) dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), 0,28 g (0,0006 mola) Rodaminy B i 0,002 g 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) rozpuszcza się w 90 cm³ bezwodnego dimetylosulfotlenku. Następnie prowadzi się reakcję w zamkniętej, chronionej przed dostępem światła i wilgoci kolbie przez 48 h przy intensywnym mieszaniu. Kolejno mieszaninę reakcyjną filtruje się, rozcieńcza 90 cm³ wody destylowanej, umieszcza w worku dializacyjnym (MWCO 3500 Da) i dializuje przez 36 h wobec 5 dm³ 5% roztworu NaHCO₃. Następnie wymienia się medium dializacyjne na wodę destylowaną kontynuuje proces przez 120 h, zmieniając co 24 h medium dializacyjne. Następnie produkt izoluje się poprzez usunięcie wody na drodze liofilizacji, uzyskując 0,63 g produktu (około 81% wyd. teoretycznej).

Przykład III

W pierwszym etapie w celu otrzymania otrzymanie soli p-toluenosulfonowej chitozanu, przeznaczonego do reakcji syntezy chitozanu z Rodaminą B przyłączoną za pośrednictwem wiązania estrowego (5 merów chitozanu przypadający na cząsteczkę Rodaminy B), do zlewki wprowadza się 0,50 g chitozanu (średni stopień deacetylacji – 80%) i 0,50 g (0,0026 mola) kwasu p-toluenosulfonowego w postaci monohydratu, a następnie dodaje 100 cm³ wody destylowanej i miesza aż do uzyskania jednorodnej, lepkiej cieczy. Otrzymany roztwór poddaje się liofilizacji, uzyskując 1,00 g soli p-toluenosulfonowej chitozanu. W następnym etapie procesu uzyskaną sól p-toluenosulfonową chitozanu (1,00 g), 0,03 g (0,00015 mola) dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), 0,07 g (0,00015 mola) Rodaminy R i 0,0005 g 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) rozpuszcza się w 90 cm³ bezwodnego dimetylosulfotlenku. Następnie prowadzi się reakcję w zamkniętej, chronionej przed dostępem światła i wilgoci kolbie przez 24 h przy intensywnym mieszaniu. Kolejno mieszaninę reakcyjną filtruje się, rozcieńcza 90 cm³ wody destylowanej, umieszcza w worku dializacyjnym (MWCO 3500 Da) i dializuje przez 12 h wobec 5 dm³ 5% roztworu NaHCO₃. Następnie wymienia się medium dializacyjne na wodę destylowaną kontynuuje proces przez 120 h, zmieniając co 24 h medium dializacyjne. Następnie produkt izoluje się poprzez usunięcie wody na drodze liofilizacji, uzyskując 0,45 g produktu (około 82% wyd. teoretycznej).

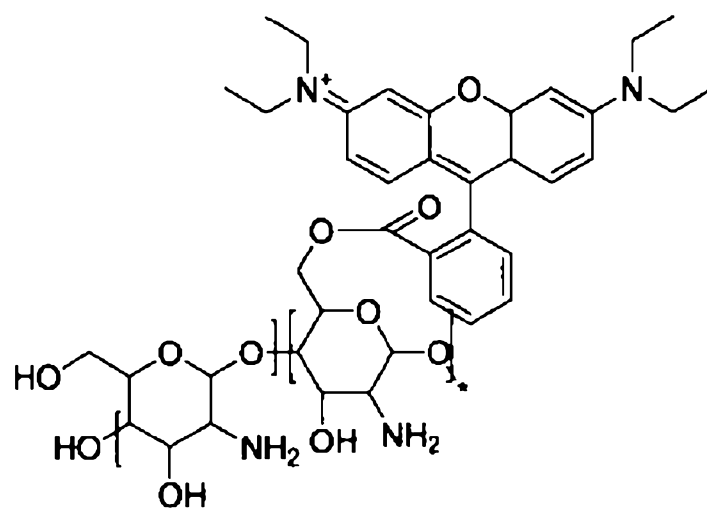
Widmo FT-IR chitozanu z Rodaminą B przyłączoną kowalencyjnie (cm⁻¹):

603, 637, 644, 667, 694, 894, 1044, 1188, 1155, 1244, 1311, 1450, 1539, 1572, 1623, 1735 (karbonyl wiązania estrowego pomiędzy chitozanem a Rodaminą B), 2851, 2926, 3326.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania chitozanu z Rodaminą B przyłączoną za pośrednictwem wiązania estrowego o wzorze ogólnym 1, **znamienny tym**, że proces przyłączenia rodaminy B prowadzi się w trzech etapach, z których pierwszy obejmuje otrzymanie soli p-toluenosulfonowej chitozanu, drugi – przyłączenie Rodaminy B do powstałej soli w warunkach Steglich'a w środowisku bezwodnego dimetylosulfotlenku, a trzeci – usunięcie grup p-toluenosulfonowych z produktu. Trzeci etap prowadzi się w warunkach dializy wobec 5% wodnego roztworu NaHCO₃, a otrzymany surowy produkt izoluje się i oczyszcza się na drodze dializy wobec wody destylowanej i liofilizacji.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że przyłączenia rodaminy B do soli p-toluenosulfonowej chitozanu prowadzi się w warunkach Steglich'a w środowisku rozpuszczalnika organicznego, korzystnie bezwodnego dimetylosulfotlenku.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces przyłączenia rodaminy B do soli p-toluenosulfonowej chitozanu prowadzi się przez 24 – 72 h, korzystnie około 48 h.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces przyłączenia rodaminy B do soli p-toluenosulfonowej chitozanu prowadzi się w temperaturze pokojowej w obecności stechiometrycznych ilości dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) jako czynnika kondensującego oraz 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP) jako katalizatora (1% mol w przeliczeniu na DCC).
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces zobojętnienie soli chitozanu z przyłączoną Rodaminą B prowadzi się w warunkach dializy wobec 5% wodnego roztworu NaHCO₃.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces zobojętnienie soli chitozanu z przyłączoną Rodaminą B prowadzi się przez około 12 – 36 h, korzystnie około 24 h.
7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że oczyszczanie produktu prowadzi się na drodze dializy wobec wody destylowanej, zmieniające kilkakrotnie medium dializacyjne, a następnie izoluje się produkt poprzez liofilizację.

Rysunek



wzór 1