



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

224 976

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 23 07 82.
(21) PV 5611 - 82

(51) Int. Cl. C 13 K 11/00

(40) Zveřejněno 27 05 83
(45) Vydáno 01 12 84

(75)

Autor vynálezu

STANĚK JAN RNDr. CSc.,
HEŘMÁNKOVÁ VĚRA ing.,
INEMAN VÁCLAV,
KEFURT KAREL ing. CSc.,

JARÝ JIŘÍ prof. ing.DrSc., PRAHA

(54)

Způsob výroby krystalické D-fruktosy

Vynález se týká způsobu výroby respektive získávání krystalické D-fruktosy, sacharidu, jehož význam v poslední době značně roste. Používá se ve farmaceutickém průmyslu a v potravinářství, v případech, kde je účelné dosáhnout stejné sladkosti při nižším obsahu energie. D-Fruktosa je přibližně 1,4x sladší než sacharosa, na dosažení shodného sladicího účinku se tedy použije nižší, pouze dvoutřetinová dávka.

Průmyslová výroba krystalické D-fruktosy je doposud velmi obtížná, s vysokými náklady. D-Fruktosa vykřystalisuje jen ze zcela čistých roztoků, prostých jakýchkoliv anorganických či organických příměsí, solí nebo stop jiných sacharidů. Odstranění takových nečistot z produktu před finální krystalisací představuje hlavní operaci u všech dosud ve světě realizovaných výrob, vycházejících přitom z levné a snadno dostupné suroviny, ze sirupovité směsi D-fruktosy a D-glukosy. Ta se získává buď z inverse sacharosy, nebo isomerisací D-glukosy, chemickou nebo enzymatickou cestou a obsahuje od přibližně 40 % až do 60 % D-fruktosy. Ovšem dělení takové směsi ať již kapalinovou chromatografií na sloupci iontoněniče (U.S. 3044904) nebo selektivním srážením vápenatých solí (Ger. 381575) je značně nákladné a zodpovídá za vysokou výrobní cenu krystalické D-fruktosy. Zdánlivě jednodušší je poslední z používaných postupů: D-glukosa se selektivně zoxidaže, chemicky nebo enzymaticky, na D-glukonovou kyselinu, jejíž separace od D-fruktosy jakožto chemicky již značně odlišné sloučeniny je snazší. Podstatnou část D-glukonové kyseliny lze ze směsi oddělit v podobě nerozpustné vápenaté nebo sodné soli (Listy cukrov. 88, 31 /1972/, Ger. Offen. 2903388). Bohužel zbytkové množství glukonanu v matečných loužích znečistí D-fruktosu ještě natolik, že její izolace z takového

roztoku krystalisací je velice obtížná, ztrátová a zdlouhavá. Výhodnější je nový japonský způsob (Japan Kokai 76 41448) dělení směsi D-glukonové kyseliny a D-fruktosy na iontoměničích, spočívající v selektivní adsorbci kyseliny na sloupci anexu; D-fruktosa se z chromatograficky čistého filtrátu isoluje krystalisací, kyselina D-glukonová se získá v čisté formě při regeneraci iontoměniče 0,15 M kyselinou mravenčí. Použití iontoměničů je v tomto případě sice výhodnější (jedná se principiálně o filtraci), než u dělení směsi D-fruktosy a D-glukosy (náročná kapalinová chromatografie dvou strukturně podobných sloučenin), ale i tak je postup výrobně velice nákladný. Na zachycení 1 kg kyseliny D-glukonové, to je na výrobu přibližně 1 kg D-fruktosy (surovina: směs D-glukosy 50 % a D-fruktosy 50 %) je zapotřebí 1000 l silného anexu typu Dowex 1 x 2, na jeho regeneraci se spotřebuje značné množství kyseliny mravenčí, je zapotřebí odpařovat obrovské objemy rozpouštědel (Japan kokai 76 41448).

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob podle vynálezu, na jehož základě lze zpracovat směsi D-fruktosy a D-glukosy po konverzi na směs D-fruktosy a D-glukonanu sodného chemickou nebo enzymatickou oxidací. Tento vodný roztok, produkt oxidace, respektive matečný roztok po odkrystalisování části D-glukonanu sodného, používaný dříve na obtížnou výrobu D-fruktosy z glukonanu krystalisací, se výborně rozdělí podle vynálezu na jednotlivé složky iontově - vylučovací chromatografií na sloupci silného katexu v sodném cyklu za použití vody jako eluentu. Směs D-fruktosy a soli kyseliny D-glukonové se ve vodném roztoku s celkovou koncentrací sacharidů 5 až 60 % hmot. nanese na sloupec vodou nasyceného styrendivinylbenzenového kopolymeru s 1 až 12 % zesíťování a nesoucího skupiny SO_3M^+ , kde M je prvek ze skupiny alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin a rozdělí se při použití vody jako eluentu při teplotě $+10^\circ$ až $+70^\circ\text{C}$, s výhodou při teplotě 15 až 30°C na frakce obsahující soli D-glukonové kyseliny a frakce obsahující D-fruktosu, ze kterých se isoluje krystalická D-fruktosa. Sól kyseliny D-glukonové, stejně jako soli jiných kyselin, je vytěšňována z matrice iontoměniče vlivem přítomných polár-

ních seskupení SO_3^-Na^+ a eluuje se tedy již s mrtvým objemem kolony. Naopak D-fruktosa, která tvoří snadno komplexy s kationty kovů drženými v matici pryskyřice, vykazuje značnou retenci při eluci deionisovanou vodou. Výsledkem je značný rozdíl v elučních časech těchto dvou sloučenin, způsobující vysokou dělicí mohutnost a kapacitu tohoto jednoduchého systému; rozdíl je nepoměrně větší, než jaký je při běžně užívaném dělení D-fruktosy od D-glukosy. Chromatograficky čistá D-fruktosa se získá odpařením příslušných frakcí a lze ji bez obtíží zkrystalisovat, např. z vodného ethanolu.

Typickými pryskyřicemi použitelnými k vynálezu jsou na jádře sulfonované styren-divinylbenzenové kopolymery. Stupeň zesíťování, to je množství divinylbenzenu v kopolymery, nemá použitý princip dělení neovlivnit. Výhodné je použití pryskyřice s 8 % divinylbenzenu.

Při dělení je výhodné použít iontoměnič cyklovaný stejným kationtem, jaký obsahuje sůl kyseliny D-glukonové. Směs D-fruktosy a D-glukonanu sodného je tedy výhodné dělit na katexu v sodném cyklu, směs D-fruktosy a D-glukonanu vápenatého na katexu ve vápenatém cyklu, apod. Rozdílné kationty vázané v iontoměniči a v dělené směsi sice neovlivní čistotu izolované D-fruktosy, znemožní ale použití vedlejšího produktu, soli kyseliny D-glukonové, jako chemického individua bez dalšího čištění.

Vliv velikosti částic iontoměniče odpovídá běžným zkušenostem z chromatografie, s rostoucí velikostí částic účinnost kolony klesá. Zrnění 75 až 150 μm , tedy taková velikost částic, která již umožňuje uspokojivý průtok mobilní fáze pouhou gravitací, dává ještě výborné dělení obou sloučenin. Dělení se podstatněji nezhorší ani při použití částic s velikostí okolo 0,3 mm až 0,5 mm, pokud je distribuce částic dostatečně úzká, jako je tomu například u Ostion LG-KS 0807 s rozmezím částic 160 až 315 μm . Průmyslové iontoměniče s velikostí částic okolo 2 mm a se šířkou jejich distribuce jsou pro tento účel již nevyhovující. Menší částice než 75 μm vyžadují již použití čerpadla na dosažení dostatečně vysokého průtoku mo-

bilní fáze, účinnost dělení se zvyšuje. V analytickém uspořádání jsme s výhodou používali částice o velikosti $13 \pm 2 \mu\text{m}$. Pro výrobu krystalické D-fruktózy postupem podle vynálezu jsou z hlediska účinnosti, jednoduchosti provedení a ceny používané naplně optimální částice s velikostí okolo 0,2 mm.

Jako mobilní fáze se při separaci používá deionisovaná voda, její odplynování není pro účinný chod chromatografického systému s katexem o velikosti částic okolo 0,2 mm nezbytné. Podstatná část mobilní fáze se regeneruje při zahušťování eluátu před vlastní krystalisací produktu.

Koncentrace roztoku sacharidů, který má být rozdělen, může být až 60 procentní. Silněji koncentrované roztoky je zapotřebí naředit, jsou příliš viskosní a ovlivňují nabobtnání pryskyřice a tím účinnost používané kolony. Obvykle se pracuje s roztoky o koncentracích 20 až 40 % přímo tak, jak přicházejí z oxidace směsi D-glukosy a D-fruktosy, bez jakékoliv úpravy.

Eluát vycházející z kolony se analyzuje metodami běžnými v analytice sacharidů. Výhodné pro tento účel je vyhodnocování jednotlivých frakcí analytickou kapalinovou chromatografií na kolonkách plněných vhodným iontoměničem jako například Ostion LG-KS 0802 ($13 \pm 2 \mu\text{m}$) v Na^+ cyklu s vodou jako mobilní fází a s refraktometrickou detekcí. Na koloně o rozměrech 300 x 4 mm při 20°C a 6 ml/h průtoku jsou eluční časy jednotlivých v úvahu připadajících sacharidů následující: D-glukonan sodný 15,7 min, sacharosa 17,2 min, D-glukosa 19,1 min, D-fruktosa 23,7 min. Vhodný průtokový diferenciální refraktometr lze použít přímo na sledování průběhu dělení na preparativní koloně, stejně jako jiné průtokové detektory používané při analytice sacharidů.

Kromě vody se při postupu podle vynálezu nespotřebovává žádná sloučenina. Náplň kolony je za používaných podmínek zcela stálá, mezi jednotlivými nástřiky nevyžaduje žádnou regeneraci. Po nástřiku se z kolony eluuje nejprve čistá voda (mrtvý objem kolony), pak vodný roztok D-glukonanu sodného, směsná

5

frakce obsahující D-glukonan sodný a D-fruktosu, a nakonec vodný roztok D-fruktosy. Při opakovaném používání postupu je výhodné další nástřik časovat ještě před ukončením prvního cyklu tak, aby se využil mrtvý objem kolony, tj. aby po D-fruktose z prvního nástřiku z kolony ihned vycházel D-glukonan sodný z nástřiku následujícího. Eluát pak sestává jen ze tří frakcí: I) vodný roztok D-glukonanu sodného, který se odpaří (regenerace mobilní fáze) a zkrystalisuje běžným způsobem; II) vodný roztok D-fruktosy, který se zahustí (regenerace mobilní fáze) a D-fruktosa se zkrystalisuje přidáním ethanolu běžným způsobem; III) směsná frakce, která se přidá k dalšímu nástřiku, rechromatografuje se.

Velkému rozdílu v elučních časech D-glukonanu sodného a D-fruktosy odpovídá vysoká kapacita iontoměniče pro separaci této směsi i při vysokých průtocích mobilní fáze, to je při velké rychlosti separace. Postupným zvyšováním zátěže kolony se na jednom litru iontoměniče typu Ostion LG-KS 0807 v sodném cyklu kvantitativně rozdělí až 70 g směsi D-glukonanu sodného a D-fruktosy (hmotnostní poměr 1 : 1) bez jakékoliv mezifrakce za 30 min. Při opakovaném provádění chromatografického dělení lze množství dělené směsi na jednotku iontoměniče dále zvýšit, mezifrakce se snadno recirkuluje. Rozdělené množství za jednotku času je nesrovnatelně vyšší než je při chromatografických separacích D-fruktosy od D-glukosy, kde se navíc podstatná část produktu izoluje v ne zcela čisté podobě (např. frakce D-fruktosy s méně než 10 % D-glukosy apod.).

Velkou výhodou tohoto způsobu dělení je fakt, že díky vysoké účinnosti systému jsou vymývané zony úzké, nedochází k rozmytí D-fruktosy do zbytečně velkého objemu mobilní fáze. Veškerá D-fruktosa se vymyje obvykle v objemu, který je jen šest až sedmkrát větší než je objem nastříkovaného roztoku.

Dělení lze s výhodou provádět při běžné teplotě místnosti, tedy při teplotách okolo +20°C, bez jakékoliv temperace. S rostoucí teplotou se účinnost kolony poněkud zvyšuje,

nárůst je ale při teplotách nad $+50^{\circ}\text{C}$ znehodnocen nižší teplotní stabilitou D-fruktosy.

Postup podle tohoto vynálezu je zvláště výhodný pro dělení produktu katalytické oxidace směsi D-fruktosy a D-glukosy na paladiu nebo na platině ve vodě vzduchem nebo kyslíkem za současné neutralisace vznikající D-glukonové kyseliny hydroxidem sodným. Produkt, přibližně 20%ní vodný roztok D-glukonanu sodného a D-fruktosy v poměru 1 : 1 lze přímo separovat, bez jakékoliv úpravy, výsledkem je čistá, krystalická D-fruktosa a čistý krystalický D-glukonan sodný, který je rovněž žádaným obchodním produktem. Touto kombinací s naším postupem se odstraní nevýhody oxidační metody dělení směsi D-glukosy a D-fruktosy, produkty se izolují kvantitativně, v čisté podobě. Celá výrobní sekvence nedává žádný odpad, spotřebovává se pouze voda, vzduch a ekvivalent hydroxidu sodného.

Tímto způsobem lze čistit s výhodou i matečné louhy po odkrystalisování D-glukonanu sodného (například srážením methanolem) z výše uvedeného produktu oxidace. Kapacita náplně při dělení takovýchto směsí, to je až 40%ních vodných roztoků (po odpaření methanolu) D-fruktosy znečištěné přibližně 10 procenty D-glukonanu sodného, je úměrně vyšší.

Uváděná výhoda postupu spočívající v současné izolaci, vedle krystalické D-fruktosy, čistého D-glukonanu sodného jako obchodního produktu, se uplatní u dělení všech směsí těchto látek, u kterých je koncentrace jiných solí nulová, nebo velmi nízká, jako například při selektivních enzymatických oxidacích D-glukosy ve směsi s D-fruktosou. V případech, kdy reakční podmínky umožňují vznik dalších kyselin při oxidaci D-glukosy, kyseliny L-guluronové, D-glukuronové a D-glukarové, je nutné čistotu sodné soli kyseliny D-glukonové kontrolovat vhodným analytickým postupem, například známou chromatografií na anexu.

Obdobně lze zpracovávat roztoky D-fruktosy znečištěné D-glukonanem vápenatým, D-glukonanem draselným nebo jinými solemi kyseliny D-glukonové.

4

Způsob podle předloženého vynálezu umožňuje, navíc k uváděnému oddělení D-fruktosy od sodné soli kyseliny D-glukonové, vyčistit D-fruktosu od příměsí D-glukosy a sacharosy. První nečistota se může v produktu objevit jako důsledek nedokonalé oxidace D-glukosy na kyselinu D-glukonovou, druhá jako důsledek nedokonalé inverse sacharosy jakožto výchozí suroviny. Sloučeniny se z kolony eluují v pořadí D-glukonan sodný, sacharosa, D-glukosa, D-fruktosa. Oddělenou mezifrakci, obsahující D-glukosu a sacharosu lze bez obtíží vracet zpět do oxidačního stupně, resp. do inverse.

Všechny zmíněné výhody postupu, který je předmětem tohoto vynálezu, jsou patrné z následujících příkladů provedení.

Příklad 1

Kateřová pryskyřice Ostion LG-KS 0807 (160 - 315 μ m) se převede do sodného cyklu běžným způsobem, promyje se vodou do neutrální reakce, drobné částice se odstraní dekantací. Vodná suspence 100 l iontoměniče se naplní do skleněné kolony s přibližným rozměrem 1 x 0,36 m a pod stálým průtokem mobilní fáze (3 l deionisované vody za minutu) se nechá usadit. Průtok mobilní fáze ze zásobníku umístěného nad kolonou se omezuje na požadovanou hodnotu kohoutem na výstupní hadici z kolony.

Roztok 0,7 kg D-fruktosy a 0,7 kg D-glukonanu sodného v 2,6 l vody se nanese na připravenou kolonu přes dvoucestný kohout umístěný na vstupní hadici do hlavy kolony tak, aby nedošlo ke vniknutí vzduchových bublin do dělicího systému. Přepnutím kohoutu se ustaví opět průtok mobilní fáze na 3 l/min. Čtyřcestným kohoutem na výstupní hadici z kolony se ještě 10 min odebírá čistá mobilní fáze (30 l), která se vrací do zásobníku nad kolonu. Po přepnutí kohoutu se 9 min odebírá eluent do zásobníku s čistým D-glukonanem sodným, ze kterého se odpařením (regenerace mobilní fáze) získá krystalický D-glukonan sodný (0,69 kg). Další minutu se eluát (čistá mobilní fáze) vrací zpět (3 l) do zásobníku mobilní fáze nad kolonu. Dalších 10 min se eluát odebírá (30 l) do zásobníku s roztokem D-fruktosy, ze které se odpařením vody ve

vakuu (regenerace mobilní fáze) získá 0,69 kg chromatograficky čisté D-fruktosy, která po krystalisaci ze směsi ethanolu a vody má b.t. 105 až 109°C, $[\alpha]_D -91^\circ$ (c 1,2; voda).

Další chromatografický cyklus se zahájí nanesením roztoku 0,7 kg D-fruktosy a 0,7 kg D-glukonanu sodného v 2,6 l vody na kolonu pomocí dvoucestného kohoutu umístěného na vstupní hadici do hlavy kolony v okamžiku, kdy začíná 2. minuta odběru D-fruktosy v předešlém cyklu. Po ukončení odběru D-fruktosy (30 l eluátu) se jednu minutu eluát (čistá mobilní fáze, 3 l) vrací zpět do zásobníku mobilní fáze nad kolonu. Dalších 9 min se eluát odebírá do zásobníku s čistým D-glukonanem sodným, ze kterého se odpařením (regenerace mobilní fáze) získá krystalický D-glukonan sodný (0,69 kg). Další minutu se eluát vrací zpět (3 l) do zásobníku mobilní fáze nad kolonu, načež se opět 10 min odebírá (30 l) roztok obsahující chromatograficky čistou D-fruktosu, která se izoluje odpařením vody ve vakuu (regenerace mobilní fáze). Získá se dalších 0,69 kg chromatograficky čisté D-fruktosy, přičemž současně probíhá na koloně již třetí separační cyklus. Délka trvání jednoho cyklu je 21 min.

Celý dělicí proces je možné plně automatisovat použitím jednoduchého programátoru, řídicího činnosti nástríkového čerpadla a uzávěrů na vstupu a výstupu kolony.

Příklad 2

Roztok 30 g D-fruktosy a 5 g D-glukonanu sodného v 35 ml vody se nanese na skleněnou kolonu 500 x 35 mm plněnou běžným způsobem katexem Ostion LG-KS 0807 (160 - 315 μ m) v sodném cyklu a promytém deionisovanou vodou. Průtok deionisované vody se udržuje na 5 ml/min měněním výšky zásobníku mobilní fáze. Na detekci eluátu se použije diferenciální refraktometr RD-1 z Vývojových dílen ČSAV a zapisovač Varian A-25. Po odebrání 125 ml mobilní fáze (mrtvý objem kolony) je eluát rozdělen podle záznamu diferenciálního refraktometru na tři frakce, jejich složení je kontrolováno analytickou kapalinovou chromatografií. Odpařením první frakce (70 ml) se získá

4,9 g D-glukonanu sodného bez jakékoliv příměsi D-fruktosy. Odpařením druhé frakce (10 ml) se získá 3 g D-fruktosy obsahující stopové znečištění D-glukonanu sodného. Odpařením třetí frakce (70 ml) se získá 27 g D-fruktosy.

Příklad 3

Roztok 5 g D-fruktosy a 0,2 g D-glukonanu vápenatého v 10 ml vody se nanese na skleněnou kolonu 500 x 35 mm plněnou katexem Dowex 50W x 8 (100 až 200 mesh, tj. 75 až 150 μm) ve vápenatém cyklu a je chromatografován stejně, jako je uvedeno v příkladu 2. Získá se 4,9 g čisté D-fruktosy a 0,2 g čistého D-glukonanu vápenatého.

Příklad 4

Na kvantitativní stanovení D-glukonanu sodného, sacharosy, D-glukosy a D-fruktosy ve vodných roztocích těchto sloučenin se použije skleněná kolona 300 x 4 mm plněná katexovou pryskyřicí československé výroby ochranné známky Ostion LG-KS 0802 ($13 \pm 2 \mu\text{m}$) v sodném cyklu. Průtok mobilní fáze (deionizovaná voda) se udržuje na 6 ml/h pumpou Varian 8500, látky jsou v eluátu detekovány diferenciálním refraktometrem Waters R-401 se zapisovačem Varian A-25 a integrátorem Varian CDS 101. Analýsy se provádí při $+20^\circ\text{C}$. Pro jednotlivé látky jsou stanoveny následující eluční časy: D-glukonan sodný 15,7 min, sacharosa 17,2 min, D-glukosa 19,1 min, D-fruktosa 23,7 min. Detekční limit v uvedeném experimentálním uspořádání je 100 ng každého sacharidu v nástřiku, relativní hmotnostní odezvy detektoru jsou stanoveny analýsou směsí o známém složení.

Stanovení D-glukonanu sodného tímto způsobem je omezeno jen na roztoky neobsahující žádné další organické nebo anorganické soli, které se rovněž eluují s mrtvým objemem kolony 15,7 min a poskytují odezvu v diferenciálním refraktometru.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

224 978

1. Způsob výroby krystalické D-fruktosy ze směsi D-fruktosy a soli kyseliny D-glukonové, vyznačující se tím, že se tato směs ve vodném roztoku s celkovou koncentrací sacharidů v rozmezí od 5 do 60 hmotnostních procent nanese na sloupec vodou nasyceného styren-divinylbenzenového kopolymeru s jedním až dvanácti procenty zesíťování a nesoucího skupiny SO_3^-M^+ , kde M je prvek ze skupiny alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin a rozdělí se při použití vody jako eluentu při teplotě $+10^\circ\text{C}$ až $+70^\circ\text{C}$, s výhodou při teplotě 15 až 30°C , na frakce obsahující soli D-glukonové kyseliny a na frakce obsahující D-fruktosu, ze kterých se isoluje krystalická D-fruktosa.
2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se kroky uvedené v bodě 1 opakují s dalším množstvím vodného roztoku směsi D-fruktosy a soli kyseliny D-glukonové na té samé koloně iontoměniče bez jakékoliv regenerace.
3. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se jako M použije kov stejný s kovem tvořícím sůl kyseliny D-glukonové, přičemž jako vedlejší produkt vedle krystalické D-fruktosy se isoluje sůl kyseliny D-glukonové s kationtem kovu M^+ .