

19



Octroiraad
Nederland

11 194919

12 C OCTROOI

21 Aanvraag om octrooi: 9301549

22 Ingediend: 07.09.1993

51 Int.Cl.7
C08B31/18, C08B15/04, C08B33/08,
C07H7/033

43 Ter inzage gelegd:
03.04.1995 I.E. 1995/07

44 Openbaargemaakt:
03.03.2003 I.E. 2003/03

47 Dagtekening:
04.07.2003

45 Uitgegeven:
01.09.2003 I.E. 2003/09

73 Octrooihouder(s):
Nederlandse Organisatie voor
Toegepast-Natuurwetenschappelijk Onderzoek
TNO te Delft.

72 Uitvinder(s):
Arie Cornelis Besemer te Amerongen
Arjan Erik Johan de Nooy te Utrecht

74 Gemachtigde:
Ir. A. van Westenbrugge c.s. te 2517 KZ Den
Haag.

54 Werkwijze voor het oxideren van koolhydraten.

Werkwijze voor het oxideren van koolhydraten

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het oxideren van koolhydraten die een primaire hydroxylgroep bevatten, met een hypohalogeniet in aanwezigheid van een katalytische hoeveelheid van een di-tertiair-alkyl-nitroxyl tot het overeenkomstige carbonzuur.

Een dergelijke werkwijze is bekend uit het artikel van Davis en Flitsch (*Tetrahedron Lett.* (1993) 1181–1184). Volgens die bekende werkwijze oxideert men methyl- of n-octylglucosiden of fructose-acetonide, met andere woorden beschermde monosachariden, met TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) in een tweefasensysteem bestaande uit dichloormethaan en een waterfase met daarin natriumwaterstofcarbonaat, kaliumbromide en tetrabutylammoniumbromide waaraan natriumhypochloriet wordt toegevoegd. Daarbij worden opbrengsten van 55–67% verkregen. De beschermde monosachariden zijn niet gevoelig voor de zijreacties van koolhydraten met hypochloriet zoals ketenafbraak en het gebruikte oplosmiddelsysteem leent zich slecht voor andere koolhydraten, in het bijzonder polysachariden.

Een werkwijze voor de oxidatie van koolhydraten waarbij een overmaat aan natriumnitriet wordt gebruikt, is bekend uit het werk van T.J. Painter et al. (*Carbohydrate Res.* 55, 95–103 (1977), *ibid.* 140, 61–68 (1985)).

De oxidatie van koolhydraten, zoals zetmeel en cellulose, is van belang omdat daarmee de eigenschappen van de koolhydraten in een gewenste richting kunnen worden veranderd. Zo zijn geoxideerde koolhydraten onder meer bruikbaar als verdikkingsmiddelen, geleermiddelen, bindmiddelen, zwelmiddelen, stabilisatoren en complexvormers (fosfaatvervangers). De meeste processen voor de oxidatie van polymere koolhydraten gaan in meer of mindere mate gepaard met een ongewenste depolymerisering (hydrolyse). Verder is een dergelijke oxidatie ook niet altijd specifiek: zo kan zetmeel zowel aan de primaire hydroxylgroep op de 6-plaats worden geoxideerd, wat leidt tot een carboxyzetmeel met een intact koolstofskelet, als aan de secundaire hydroxylgroepen op de 2,3-plaatsen, wat tot een verbreking van de koolstofkoolstofketen in de glucose-eenheden ("dicarboxyzetmeel") leidt.

Geoxideerde koolhydraten met een intact koolstofskelet, dat wil zeggen koolhydraten die aan de primaire hydroxylfunctie zijn geoxideerd, in het algemeen aangeduid als polyuronzuren, hebben voor bepaalde toepassingen, zoals als complexvormer of als stabilisator, vaak voordeel.

Volgens de bovenbeschreven bekende werkwijze volgens T.J. Painter et al. wordt cellulose of amylose met natriumnitriet in fosforzuur geoxideerd. Daarbij wordt een product verkregen dat, in het geval van de oxidatie van cellulose, een gehalte van 87,5% aan glucuronzuur heeft en, in het geval van oxidatie van amylose, bij een opbrengst van 66 respectievelijk 86% een gehalte aan glucuronzuur van 67–75% respectievelijk 52–56% heeft.

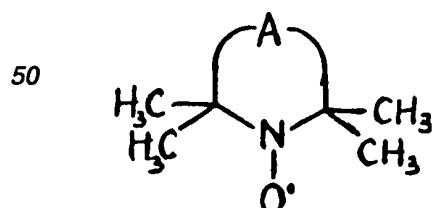
Nadelen van deze bekende werkwijze zijn het hoge verbruik aan oxidatiemiddel en de lange reactietijd (24 uur of meer). Bovendien moet het reactiemengsel aan bepaalde eisen wat betreft viscositeit en schuimvorming voldoen. Verder is een hogere effectieve opbrengst gewenst.

Gevonden is nu een werkwijze die de genoemde nadelen niet heeft en een hogere specificiteit en selectiviteit (voor oxidatie van primaire alcoholfuncties) dan de bekende oxidaties heeft.

Hiertoe heeft de in de aanhef genoemde werkwijze als kenmerk, dat men het koolhydraat in een basisch waterig milieu in een eenfasensysteem oxideert. Men werkt dus niet in een tweefasensysteem zoals toegepast door Davis en Flitsch (zie boven).

Dankzij de werkwijze volgens de uitvinding kan in een aanzienlijk kortere tijd (enkele minuten), bij verbruik van niet meer dan een ongeveer stoichiometrische hoeveelheid oxidatiemiddel, een geoxideerd koolhydraat worden verkregen dat, wat betreft oxidatiegraad, selectiviteit van de oxidatie en vermindering van depolymerisatie, superieur is aan de producten van de bekende werkwijzen.

Het di-tertiair-alkyl-nitroxyl kan bij voorbeeld di-tert-butyl-nitroxyl zijn, maar is in het bijzonder een cyclische verbinding die voldoet aan onderstaande formule:

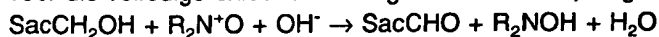


55 In deze formule stelt A een keten van bij voorkeur twee of drie atomen, in het bijzonder koolstofatomen (methylengroepen) of een combinatie van een of twee koolstofatomen met een zuurstof- of stikstofatoom, voor, die eventueel met een of meer groepen, zoals een alkylgroep, een alkoxygroep of een oxogroep kan

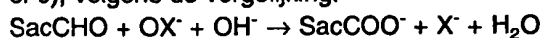
zijn gesubstitueerd. Met de meeste voorkeur gebruikt men in de werkwijze volgens de uitvinding 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO). Het di-tert-alkyl-nitroxyl kan eventueel in het reactiemedium worden bereid, bij voorbeeld door oxidatie van het overeenkomstige ditert-alkyl-amine met waterstofperoxide en wolframaat.

- 5 De oxidatie van alcoholen met hypochloriet in aanwezigheid van nitroxylverbindingen zoals TEMPO is op zichzelf bekend. Volgens de bekende werkwijzen worden echter alleen eenvoudige alcoholen geoxideerd, en wordt daarbij een tweefasensysteem toegepast (zie bijvoorbeeld P.L. Anelli et al, *J. Org. Chem.* 54, 2970–2972 (1989)).

10 Onder een katalytische hoeveelheid nitroxyl wordt verstaan een hoeveelheid die – na omzetting van het nitroxyl-radicaal tot het overeenkomstige nitrosoniumion – minder is dan een voor oxidatie van alle primaire hydroxylgroepen tot carboxylgroepen benodigde hoeveelheid, in het bijzonder van minder dan 10% van de voor die volledige oxidatie benodigde hoeveelheid, volgens de volgende bruto reactievergelijking:



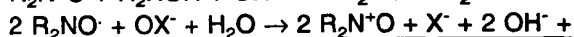
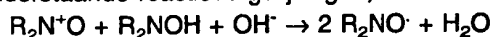
15 Hierin stelt Sac de rest van een monosacharide-eenheid en R een tertiaire alkylgroep voor, waarbij de twee groepen R aan elkaar kunnen zijn verbonden. De oxidatie met nitroxyl tot aldehyd wordt gevolgd door oxidatie van het aldehyd tot carboxzuur met een ander oxidatiemiddel zoals hypohalogeniet (OX⁻; X = Cl, Br of J), volgens de vergelijking:



20 Een grotere hoeveelheid nitroxylverbinding dan 10 gew.% is niet schadelijk, maar is in verband met de hogere kosten niet aantrekkelijk. Bij voorkeur bedraagt de katalytische hoeveelheid nitroxyl 0,005–5 gew.%, met meer voorkeur 0,1–2,5 gew.%, en in het bijzonder 0,25–1,5 gew.% ten opzichte van het koolhydraat. Uitgedrukt in mol% bedraagt de katalytische hoeveelheid nitroxyl ten opzichte van het koolhydraatmonomeer bij voorkeur 0,1–2,5 mol%.

25 De oxidatie kan worden uitgevoerd in water met een hypohalogeniet als oxidatiemiddel, bij voorkeur in de vorm van een zout daarvan, zoals lithium-, natrium-, kalium- of calcium-hypochloriet. Van het oxidatiemiddel gebruikt men bij voorkeur 0,8–2 equivalenten, met meer voorkeur 0,9–1,5 equivalenten en in het bijzonder 1–1,2 equivalenten. In molverhouding zijn de te gebruiken hoeveelheden oxidatiemiddel respectievelijk 1,6–4, 1,8–3 en 2–2,4 mol per mol monosacharide-eenheid.

30 Verondersteld wordt dat het hypohalogeniet het bij de oxidatie van de hydroxylgroep van het polysacharide gevormde hydroxylamine terug oxideert tot het overeenkomstige nitroxylradicaal of het overeenkomstige nitrosoniumion $\text{R}_2\text{N}^+=\text{O}$, dat vervolgens weer een hydroxylgroep kan oxideren, zoals weergegeven in onderstaande reactievergelijkingen, waarin het hypohalogeniet is weergegeven als OX⁻.



35 $\text{R}_2\text{NOH} + \text{OX}^- \rightarrow \text{R}_2\text{N}^+\text{O} + \text{X}^- + \text{OH}^-$ (bruto)

40 Als hypohalogeniet kan hypochloriet, bijvoorbeeld natriumhypochloriet, worden gebruikt. Met voordeel kan ook gebruik worden gemaakt van hypobromiet, dat dan bij voorkeur in het reactiemedium uit hypochloriet en bromide wordt verkregen. Naast een equivalente hoeveelheid of een geringe overmaat hypochloriet, is hierbij een ondermaat bromide, of zelfs een katalytische hoeveelheid bromide, voldoende. Bij voorkeur gebruikt men 0,2–1 equivalent (0,4–2 mol/mol monosacharide-eenheid) bromide.

45 De werkwijze volgens de uitvinding is bruikbaar voor het oxideren van koolhydraten van zeer uiteenlopende aard en herkomst (plantaardig, dierlijk, microbieel, synthetisch). Zowel monomere koolhydraten (monosachariden, suikeralcoholen), als dimere, oligomere en polymere koolhydraten kunnen worden geoxideerd, wanneer deze een primaire hydroxylgroep bezitten. Voorbeelden van polymere koolhydraten zijn β -glucanen, in het bijzonder cellulose en fracties, derivaten en hydrolyseproducten daarvan, α -glucanen, in het bijzonder zetmeel en fracties, derivaten en hydrolyseproducten – zoals amylose en amylopectine – daarvan, en cyclische equivalenten daarvan zoals cyclodextrine, verder andere polysachariden, zoals inuline, en natuurlijke of kunstmatige gommen, zoals xanthaan, guar, johannisbroodmeel, algine, arabische gom, dragant, carrageen, agar, ghatti, chitine e.d. In het bijzonder is de werkwijze geschikt voor de oxidatie

50 van oligosachariden en polysachariden, zoals zetmeel, cellulose of inuline, of een fractie, een hydrolyseproduct of een derivaat daarvan.

De werkwijze volgens de uitvinding kan worden toegepast voor de bereiding van volledig gecarboxyleerde koolhydraten, met andere woorden van polyuronzuren. Men kan de werkwijze echter ook met voordeel toepassen voor het bereiden van gedeeltelijk gecarboxyleerde koolhydraten, waarin slechts een

55 deel van de primaire hydroxylgroepen van het koolhydraat is geoxideerd. Bij voorkeur bereidt men koolhydraten met een carboxylgehalte van ten minste 75%, in het bijzonder van ten minste 90%. De uitvinding heeft tevens betrekking op polyuronzuren met een uronzuurgehalte van ten minste 90%.

De werkwijze volgens de uitvinding wordt uitgevoerd in een basisch reactiemedium. In het bijzonder past men een pH van 9–13, bij voorkeur een pH van 10,3–11,5 toe.

De reactietemperatuur kan variëren van ongeveer -5°C tot ongeveer 30°C . Bij voorkeur wordt de reactie uitgevoerd bij temperaturen van 10°C of minder en met meer voorkeur bij ongeveer $0-5^{\circ}\text{C}$.

- 5 Na de reactie kan het mengsel worden opgewerkt en kan het geoxideerde koolhydraat worden geïsoleerd door toevoegen van een oplosmiddel waarin de anorganische stoffen oplossen en het product niet oplost, bij voorbeeld een alcohol. Verdere zuivering kan op op zichzelf bekende wijze worden uitgevoerd. De opbrengsten aan uronzuur liggen in het algemeen boven 90%. Het als katalysator gebruikte di-tertiair-alkylnitroxyl kan uit het reactiemengsel worden teruggewonnen, bij voorbeeld door extractie met een ether.

10

Voorbeelden

Algemeen

- Aardappelzetmeel (in water oplosbaar, 21,5% amylose, 10% water) en β -cyclodextrine (13,5% water) waren afkomstig van Avebe. Amylodextrine (polymerisatiegraad 25) werd verkregen uit waxy-maïszetmeel met pullulanase (zie Nederlands octrooischrift 165500). Microkristallijne cellulose (Avicel) was afkomstig van Merck. 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl was van analytische kwaliteit (Sigma). Polygalacturonzuur (98%) was afkomstig van Sigma; D_{12}O (99,9%) van Isotec Inc. en ethanol (96%) van Gist-Brocades.

- 20 NMR-spectra werden opgenomen met een VARIAN UNITY-400 spectrometer (^1H -resonantiefrequentie 400 MHz , ^{13}C -resonantiefrequentie 101 MHz). ^{13}C -NMR-spectra werden "gated decoupled" opgenomen waardoor een kwantitatieve bepaling mogelijk was. Alle monsters werden opgelost in D_2O . HPLC-analyse werd uitgevoerd met een Ultrapac TSK G5000PW kolom van $7,5 \times 600\text{ mm}$, gekoppeld aan een RI-detector (Spectra Physics, SP 8430). Als eluens werd fosfaatbuffer ($0,1\text{ M NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ met 1 M NaOH op pH 7 gebracht) gebruikt. De absorptie bij 520 nm werd gemeten met een Perkin-Elmer Lambda 5 UV/VIS spectrofotometer. Er werd gecentrifugeerd in een Sorvall RC-5B apparaat.

- 25 De reactiemengsels werden opgewerkt door uitgieten in 96% (70% van het volume van het reactiemengsel), waardoor het product neersloeg. Het witte neerslag werd gecentrifugeerd, opgenomen in ethanol/water (70/30 v/v), nogmaals gecentrifugeerd, opgenomen in 96% ethanol en weer gecentrifugeerd. Het verkregen product werd onder verminderde druk gedroogd.

- Het gehalte aan glucuronzuur werd bepaald met behulp van de uronzuur-bepaling van Blumenkrantz en Abdoe-Hansen, *Anal. Biochem.* 54, 484 (1973). Er werd een ijklijn gemaakt van polygalacturonzuur (5, 10, 15, 20 μg). Van het reactieproduct werden steeds monsters van $20\text{ }\mu\text{g}$ gemeten waarvan aan de hand van de ijklijn het percentage glucuronzuur werd bepaald. Het carboxylgehalte van het product werd bepaald door titratie van $0,2\text{ g}$ product met een $0,10\text{ M NaOH}$ -oplossing, dan wel door toevoegen van een overmaat $0,1\text{ M}$ calciumacetaat-oplossing en terugtitratie van het vrijgekomen azijnzuur met $0,10\text{ M NaOH}$. Het relatieve molecuulgewicht werd bepaald met HPLC. De producten werden verder gekarakteriseerd met behulp van NMR.

35

Voorbeeld I

- 40 In water oplosbaar aardappelzetmeel (droog gewicht 2 g , $12,3\text{ mmol}$ anhydroglucose-eenheid (AGU)) werd opgelost in water (200 ml). Vervolgens werd TEMPO (1 gew.% ten opzichte van het polysaccharide ($0,02\text{ g}$, $0,13\text{ mmol}$)) toegevoegd en in ongeveer 20 minuten opgelost. Vervolgens werd $1,5\text{ g}$ ($14,6\text{ mmol}$) natriumbromide toegevoegd en werd de oplossing op 0°C gebracht. Een oplossing van hypochloriet (45 ml , 4% oplossing, $25,2\text{ mmol}$) werd met 3 M HCl op de pH 10,8 gebracht en tot 0°C afgekoeld. De oplossing werd in één keer aan de oplossing van polysaccharide en TEMPO toegevoegd. Het verloop van de reactie 45 werd gevolgd aan de hand van het loogverbruik, dat equivalent is aan de uronzuurvorming (zie figuur 1). Tijdens de reactie liep de temperatuur tot maximaal 5°C op. Na een reactieduur van 30 minuten werd het mengsel opgewerkt en geanalyseerd zoals hierboven aangegeven. De resultaten zijn weergegeven in onderstaande tabel 1. Van het bij pH 10,8 geoxideerde product werd een ^{13}C -NMR spectrum (101 MHz) opgenomen; de absorptie bij 177 ppm is karakteristiek voor de geoxideerde primaire alcoholfunctie op C-6. 50 (zie figuur 3).

TABEL 1

Opbrengst en uronzuurgehalte van opgewerkte producten

5 pH	opbrengst %	verbruik ml 0,5M NaOH ^a	uronzuur (%) ^b	COOH (%) ^c
9,3	99	24,3	86	—
9,8	90	25,6	87	—
10 10,3	97	23,3	94	—
10,8	96	24,1	92	92
11,3	89	23,5	95	—

^a Totaal aantal ml 0,5M NaOH toegevoegd voor oxidatie werd gestopt.

^b Bepaald volgens uronzuurassay. Polygalacturonzuur was referentie.

15 ^c Berekend met het molecuulgewicht van polyglucuronzuur (dus M monomeer = 176).

Voorbeeld II

Voorbeeld I werd herhaald, met als verschil dat de pH werd gevarieerd. De invloed van de pH op het reactieverloop is weergegeven in figuur 2. De resultaten zijn weergegeven in tabel 1. Uit HPLC-analyse
20 bleek dat bij een pH boven 11,5 een aanzienlijke afbraak van het polymeer plaats vond.

Voorbeeld III

Voorbeeld I werd herhaald, met als verschil dat in plaats van 0,02 g TEMPO, respectievelijk 0, 0,002, 0,005 en 0,01 g TEMPO werden toegepast. Het reactieverloop is weergegeven in figuur 4.

25

Voorbeeld IV

Voorbeeld I werd herhaald, met als verschil dat in plaats van 1,5 g natriumbromide respectievelijk 0, 0,02 en 0,5 g natriumbromide werd toegepast. Het reactieverloop is weergegeven in figuur 5.

30 Voorbeeld V

Amylose (droog gewicht 3 g, 18,5 mmol) werd gesuspenseerd in 200 ml water. Aan de suspensie werden 0,03 g TEMPO (0,19 mmol) en 1,5 g natriumbromide (14,6 mmol) toegevoegd. De suspensie werd op 0°C gebracht en er werd 65 ml 4% hypochloriet met een pH van 10,6 bij 0°C toegevoegd. De pH werd met een pH-stat. tijdens de reactie op 10,6 gehouden door toevoegen van 0,5M NaOH. De reactie werd na 3 uur bij
35 0°C beëindigd door toevoegen van een overmaat ethanol. Er was toen 30,5 ml 0,5M NaOH toegevoegd. Het mengsel werd op de hierboven beschreven wijze opgewerkt. Opbrengst: 92%. Uronzuurgehalte: 75%.

Voorbeeld VI

40 Tarwezetmeel (droog gewicht 3 g, 18,5 mmol) werd gesuspenseerd in 200 ml water en op de wijze volgens voorbeeld V geoxideerd. De reactie werd na 2 uur bij 0°C beëindigd door toevoegen van ethanol. Er was toen 32 ml 0,5M NaOH toegevoegd. Na opwerken op de hierboven beschreven wijze werden een opbrengst van 94% en een uronzuurgehalte van 81% gevonden.

45 Conclusies

1. Werkwijze voor het oxideren van koolhydraten die een primaire hydroxylgroep bevatten, met een hypohalogeniet in aanwezigheid van een katalytische hoeveelheid van een di-tertiair-alkyl-nitroxyl tot het overeenkomstige carbonzuur, met het kenmerk, dat men het koolhydraat in een basisch waterig milieu in
50 een eenfasestelsysteem oxideert.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het koolhydraat een oligosacharide of polysacharide is.
3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het koolhydraat zetmeel, cellulose of inuline, of een fractie, een hydrolyseproduct of een derivaat daarvan is.

4. Werkwijze volgens conclusie 2 of 3, met het kenmerk, dat men een pH van 9–13 toepast.
5. Polyuronzuur verkrijgbaar met de werkwijze volgens conclusie 3, dat een uronzuurgehalte van ten minste 90% heeft.

Hierbij 5 bladen tekening

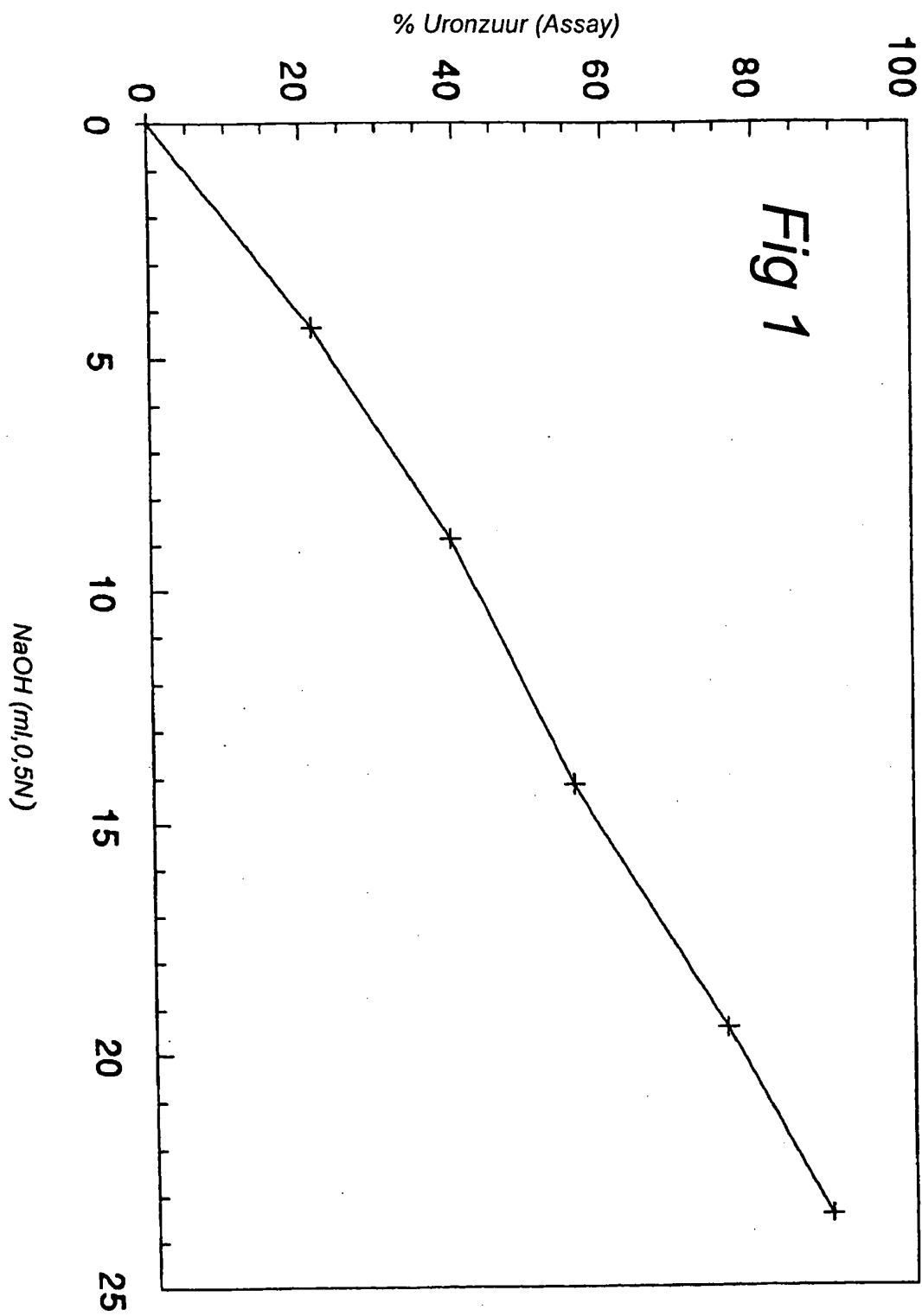


Fig 2

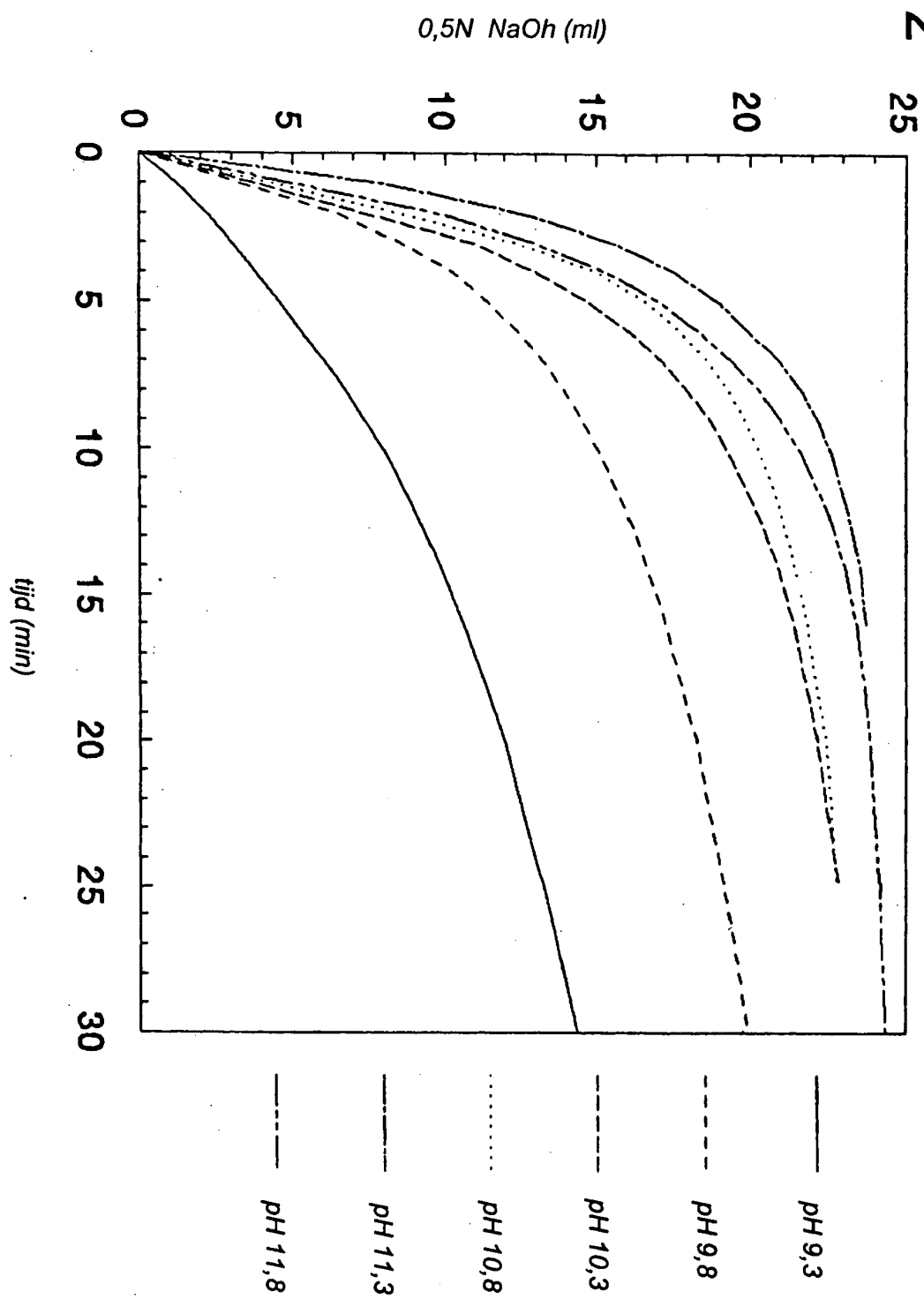


Fig 3

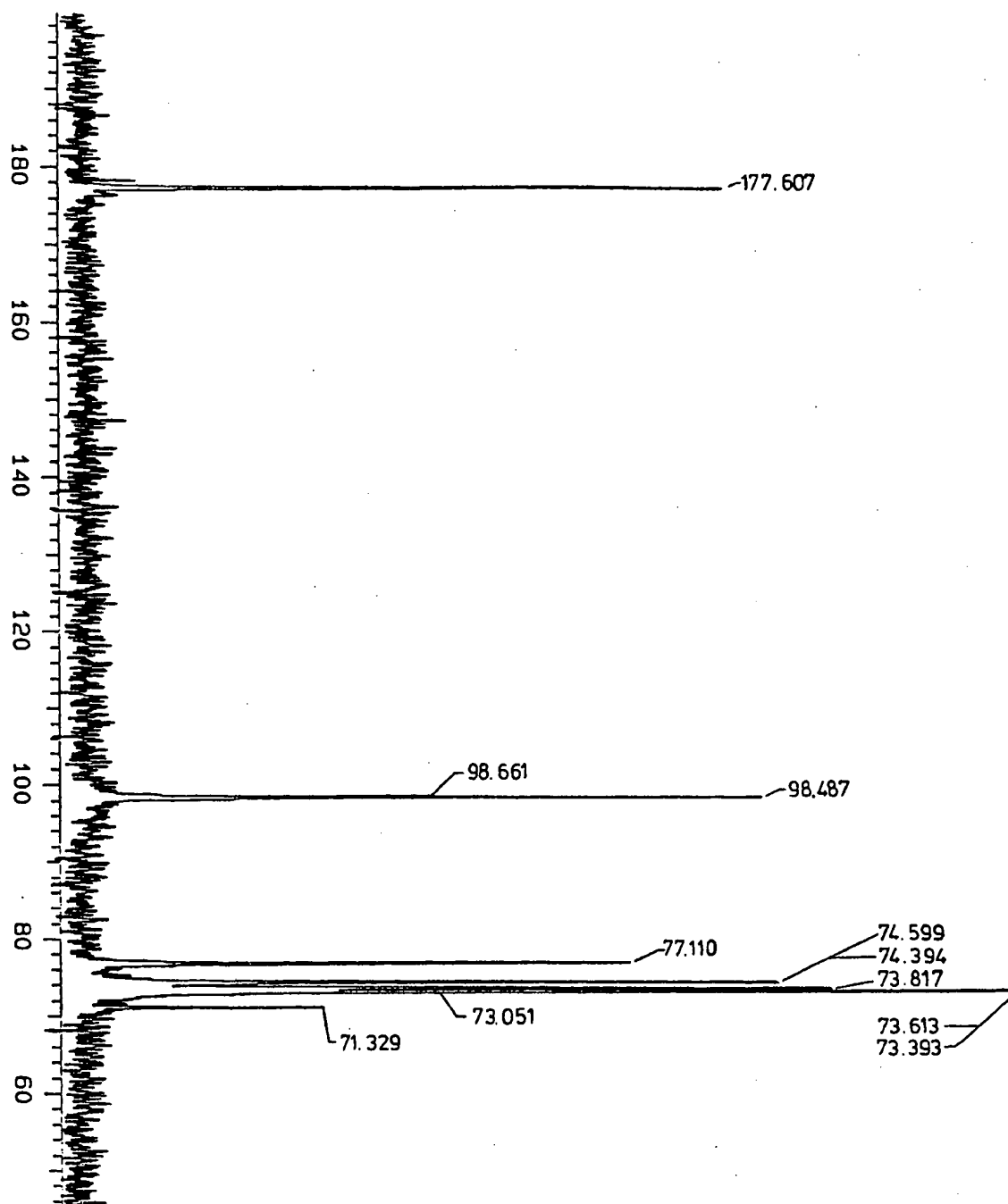


Fig 4

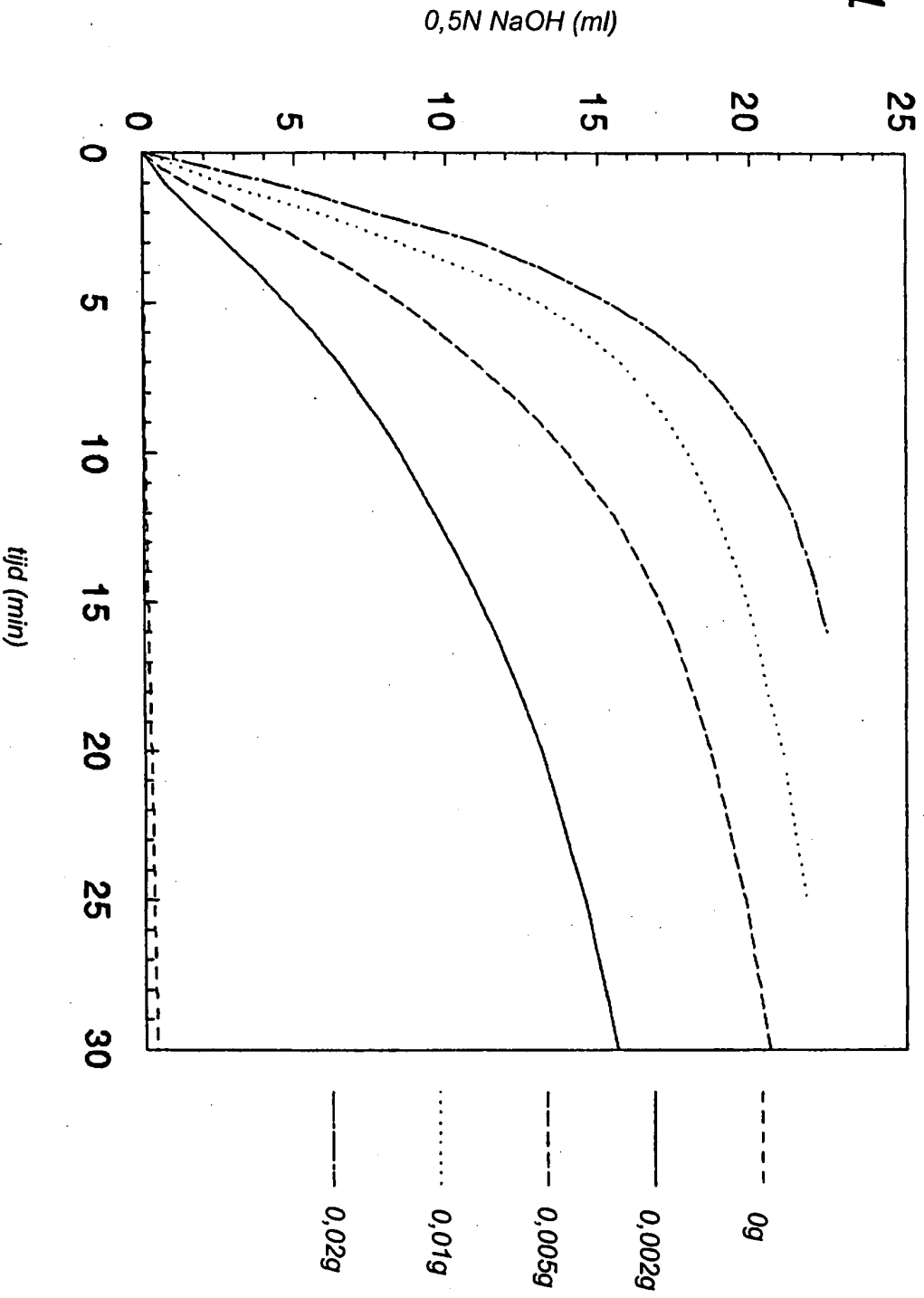


Fig 5

