UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:
30 447

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:
C08B 37/04 (2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-33193**
(22) Přihlášeno: **15.12.2016**
(47) Zapsáno: **07.03.2017**

(73) Majitel:
Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha 10, CZ
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 6 - Dejvice, CZ
Ústav chemických procesů AV ČR, v.v.i., Praha 6 - Suchdol, CZ

(72) Původce:
Ing. Tomáš Taubner, Ph.D., Praha 4 - Modřany, CZ
Andriy Synytsya, Kralupy nad Vltavou, CZ
prof. Ing. Milan Marounek, DrSc., Hradištko, CZ
Ing. Jiří Sobek, Ph.D., Bruntál, CZ

(74) Zástupce:
PATENTOVÁ KANCELÁŘ, Mgr. Hana Jirkalová, Michelská 18/12a, 140 00 Praha 4

(54) Název užitného vzoru:
N-Alkylamidy kyseliny alginové

CZ 30447 U1

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitného vzoru splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

N-Alkylamidy kyseliny alginové

Oblast techniky

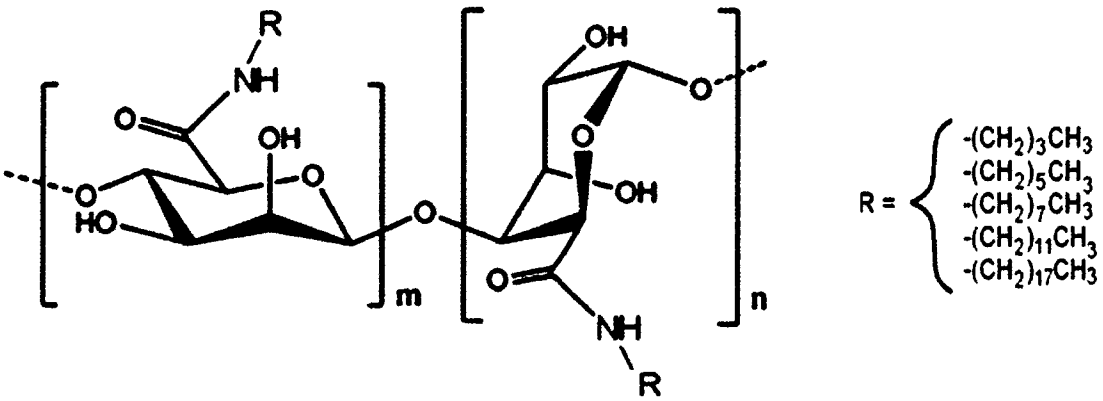
Řešení se týká *N*-alkylamidů kyseliny alginové připravené pomocí amino-de-alkoxylace methylového esteru této kyseliny nebo přímé reakce s *n*-butylaminem, *n*-hexylaminem, *n*-oktylaminem, *n*-dodecylaminem a *n*-oktadecylaminem. Postupy přípravy zahrnují řadu kroků vedoucích ke vzniku *N*-alkylamidů s různou délkou alkylového řetězce.

Dosavadní stav techniky

Algin je název pro alginovou kyselinu a její soli algináty. Algináty jsou nevětvené lineární kopolymery (1 až 4)-vázáných uronových kyselin β-D-mannuronové a α-L-guluronové. Obvykle je poměr těchto kyselin 1:1. Algináty se získávají z hnědých řas (*Phaeophyceae*). Algináty mají různé průmyslové použití, využívají se pro úpravu viskozity, jako stabilizátory nebo zahušťovadla, nebo jsou schopné vytvářet filmy a mohou se aplikovat jako pojivové materiály. Aplikují se zejména v potravinářském průmyslu díky schopnosti tvořit termostabilní gely, v textilním tisku, výrobě keramiky, při svařování drátů a ve farmaceutickém průmyslu pro výrobu obvazů a dentální otiskovací hmoty. Mohou být použity k zapouzdření buněk a léků. Výzkumy ukazují, že jedinečné fyzikálně-chemické vlastnosti alginátu mohou být úspěšně využity pro medicínské aplikace. Poptávka po těchto alginátech neustále narůstá, proto se hledají nové deriváty alginátů a jejich nové způsoby přípravy. Amidy kyseliny alginové jsou obecně známé například podle patentu US 2881161, kde je probrána obecná problematika přípravy amidů.

Podstata technického řešení

Uvedené nedostatky odstraňují *N*-alkylamidy kyseliny alginové podle technického řešení, jehož podstata spočívá v novosti *N*-alkylamidů kyseliny alginové obecného vzorce (I)



(I),

ve kterém

R značí butyl, hexyl, oktyl, dodecyl a oktadecyl,

m značí počet jednotek kyseliny β-D-mannuronové a je v rozmezí 25 až 1000,

n značí počet jednotek kyseliny α-L-guluronové a je v rozmezí 25 až 1000,

přičemž poměr m:n v molekule kyseliny alginové je 1:1 při celkovém počtu jednotek kyselin v rozmezí 50 až 2000.

Mezi *N*-alkylamidy kyseliny alginové se podle technického řešení řadí amidy s různou délkou alkylového řetězce a to *N*-butylamid kyseliny alginové, *N*-hexylamid kyseliny alginové, *N*-okty-

lamid kyseliny alginové, *N*-dodecylamid kyseliny alginové a *N*-oktadecylamid kyseliny alginové. Vzorec I znázorňuje *N*-alkylamidy kyseliny alginové, kdy uhlovodíkový zbytek R značí jednotlivé alkyly (butyl, hexyl, oktyl, dodecyl a oktadecyl) vázané prostřednictvím amidové vazby na lineární řetězec polysacharidu. Kyselina alginová se skládá z (1 až 4)-vázáných uronových kyselin β-D-mannuronové a α-L-guluronové, kde vzorec I znázorňuje amidy jednotlivých kyselin, které jsou značeny indexy m pro kyseliny β-D-mannuronové a n pro α-L-guluronové. V molekule kyseliny alginové je obvykle poměr m:n 1:1. Tyto jednotlivé fragmenty se vyskytují náhodně a tvoří úseky pouze kyseliny β-D-mannuronové, kyseliny α-L-guluronové nebo střídavě vyskytujících se obou kyselin. Molekulová hmotnost alginátu sodného pro přípravy sloučenin byla v rozmezí od 10000 do 400000.

Reakcemi methylesteru kyseliny alginové s primárními aminy nebo přímou amidací kyseliny alginové byly připraveny nové sekundární amidy (*N*-alkylamidy). Touto chemickou modifikací polysacharidů v závislosti na struktuře alkylaminu a *DS* byly získány N-alkylamidy kyseliny alginové s velkou škálou fyzikálně chemických vlastností. Hydrofobní amidované deriváty obsahující n-alkylové skupiny (C4 až C18) jsou schopny fungovat jako sorbenty nepolárních sloučenin a tím snižovat in vivo hladinu neutrálních sterolů a triacylglycerolů. (Marounek *et al.*, 2007; 2010a; 2010b; 2013). Tak například amino-de-alkoxylace vysoko methylovaného (HM) citrusového pektinu s n-alkylaminy vedla k přípravě řady N-alkylpektinamidů (Sinitsya et al., 2000; Synytsya et al., 2003) a ve vodě nerozpustného N-oktadecylpektinamidu, který byl zajímavým produktem vzhledem k jeho amfifilním vlastnostem, tedy jeho schopnosti absorbovat nepolární a polární molekuly (Synytsya et al., 2004). Na základě pokusů in vivo a in vitro bylo prokázáno, že produkty amino-de-alkoxylace methylových esterů monokarboxycelulosy a karboxymethylcelulosy mají podobné účinky jako deriváty HM pektinu (Marounek *et al.*, 2007; 2010a; 2010b; 2013). Předpokládá se, že kyselina alginová je velice účinnou látkou v této problematice. Výhodou je přítomnost karboxylových skupin v molekule bez nutnosti polysacharid oxidovat, karboxymethylovat nebo jinak modifikovat.

Pro řadu aplikací je nutné, aby měl vzniklý polysacharid amfifilní nebo nepolární vlastnosti, čehož lze dosáhnout adicí *n*-alkylových skupin. *N*-Alkylamidy kyseliny alginové byly připraveny chemickou modifikací karboxylových skupin přímou amidací s *n*-alkylaminy za podpory mikrovlnného ohřevu nebo esterifikací s následnou amino-de-alkoxylací s *n*-alkylaminy s využitím nebo bez využití mikrovlnného ohřevu (obr. 1). Vzniklé amidové vazby jsou velice pevné a jedná se tedy o velmi stabilní sloučeniny. Celá makromolekula polysacharidu díky navázání *n*-alkylového řetězce získává hydrofobní charakter. Původcům se podařilo získat mnohem vyšších výtěžků konečných sloučenin, než bylo dosud běžné. Zejména nově použitý mikrovlnný ohřev při syntéze oxidované celulózy a jejích derivátů byl velmi přínosný.

N-Alkylamidy kyseliny alginové (*N*-butylamid, *N*-hexylamid, *N*-oktylamid, *N*-dodecylamid, *N*-oktadecylamid) podle technického řešení vznikly po promytí průmyslově vyráběné sodné soli kyseliny alginové směsí etanol:voda s 4 $mol.l^{-1}$ HCl pro přípravu kyseliny alginové. Kyselina alginová byla dále esterifikována s následnou amino-de-alkoxylací nebo přímo amidována. Methylester kyseliny alginové je pak možné opět amino-de-alkoxylovat za vzniku *N*-alkylamidů. Těmito postupy byly připraveny *N*-alkylamidy podle technického řešení s různě dlouhým alkylovým řetězcem.

N-Alkylamidy kyseliny alginové podle technického řešení jsou zajímavé jako látky schopné vázat neutrální steroly s předpokladem snižovaní hladiny cholesterolu v organismu. To je důležité zejména v medicíně. Zejména *N*-oktadecylamid kyseliny alginové získaný podle technického řešení byl úspěšně původci vyzkoušen pomocí *in-vitro* a *in-vivo* pokusů ve Výzkumném ústavu živočišné výroby, v. v. i., Praha, CZ. Přípravy a analýzy derivátů probíhaly na Ústavu sacharidů a cereálií Vysoké školy chemicko-technologické, Praha, CZ; reakce s využitím mikrovlnného ohřevu na Ústavu chemických procesů Akademie věd České republiky, Praha, CZ.

Objasnění výkresů

Na přiložených výkresech je na Obr. 1 znázorněno celé reakční schéma přípravy *N*-alkylamidů kyseliny alginové podle technického řešení. Na Obr. 2 jsou FTIR Ramanova spektra alginátu

sodného (a), kyseliny alginové (b) a methylesteru kyseliny alginové (c), na Obr. 3 jsou FTIR a FT Ramanova spektra produktů amino-de-alkoxylace methylového esteru kyseliny alginové s *n*-butylaminem (a), *n*-hexylaminem (b), *n*-oktylaminem (c), *n*-dodecylaminem (d) a *n*-oktadecylaminem (e).

Následující příklady provedení popisují přípravu *N*-alkylamidů kyseliny alginové podle technického řešení, ale nijak ji neomezují.

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1

N-Alkylamidy kyseliny alginové podle technického řešení byly připraveny podle reakčního schématu, které je uvedeno na Obr. 1.

Výchozí komerčně dostupnou látkou byl alginát sodný s průměrným obsahem COO^- skupin 0,65 až 0,85 %. Pro modifikace byly vybrány *n*-alkylaminy s různě dlouhým alkylovým řetězcem: *n*-butylamin, *n*-hexylamin, *n*-oktylamin, *n*-dodecylamin a *n*-oktadecylamin. Další látky potřebné pro přípravu a izolaci byly methanol, *N,N*-dimethylformamid (DMF), kyselina chlorovodíková (HCl), petroleter, ethanol, aceton a destilovaná voda. Následující příklady podle technického řešení popisují přípravu *N*-alkylamidů kyseliny alginové.

Příprava kyseliny alginové

Kyselina alginová byla připravena promytím alginátu sodného směsí etanol:voda (7:1 v/v) obsahující 0,5 $mol.l^{-1}$ HCl, následně stejnou směsí bez HCl, 96% ethanolem, acetonem a následně vysušena na vzduchu.

Příprava methylového esteru kyseliny alginové

Kyselina alginová byla podrobena esterifikaci methanolem v přítomnosti kyseliny sírové. Navážka kyseliny alginové (1 g) byla suspendovaná v 200 ml metanolu, za neustálého míchání byl přidán 1 ml koncentrované 96% kyseliny sírové. Reakce probíhala pod refluxem po dobu 72 h při 60 °C. Pevný podíl byl odfiltrován, promyt etanolem, acetonem a vysušen na vzduchu.

Amino-de-alkoxylace methylového esteru kyseliny alginové

N-Alkylamidy kyseliny alginové podle technického řešení byly připraveny reakcí methylového esteru kyseliny alginové s *n*-alkylaminy. Methylový ester (0,5 g) byl suspendován v 50 ml DMF mícháním po dobu 30 minut a poté bylo přidáno 10 ml kapalného aminu (*n*-butylaminu, *n*-hexylaminu nebo *n*-oktylaminu). V případě pevných aminů (*n*-dodecylamin a *n*-oktadecylamin) reakční směs byla připravena rozpouštěním 5 g pevného aminu v 50 ml DMF při teplotě 55 °C za stálého míchaní po dobu 30 minut; poté bylo přidáno 0,5 g methylového esteru kyseliny alginové. Reakce probíhaly 24 h při teplotě 25 °C (kapalné aminy) nebo 72 h při teplotě 55 °C (pevné aminy). V případě heterogenních reakcí byly vzniklé produkty izolovány filtrací; pokud reakční směs byla homogenní, produkty byly vysráženy destilovanou vodou a poté zfiltrovány. Následně byly všechny deriváty promyty směsí etanol:voda (7:1 v/v) obsahující 0,5 $mol.l^{-1}$ HCl, petroletherem, ethanolem, acetonem a vysušeny na vzduchu. Postup promývání byl 2 až 3x opakován.

Příklad 2

Přímá amidace kyseliny alginové za podpory mikrovlnného ohřevu

Alternativním postupem byla přímá amidace kyseliny alginové za podpory mikrovlnného ohřevu. Reakce probíhaly ve 250 ml varné baňce. Navážky látek a činidel byly stejné jako v případě amino-de-alkoxylace, viz Příklad 1; kyselina alginová byla použita místo methylového esteru. Výkon reaktoru byl nastaven na 150 W a reakční čas 5 minut. Připravené produkty byly izolovány filtrací a přečištěny stejným způsobem. Tento postup přímé amidace dával výrazně nižší výtěžky, avšak lze ho doporučit pro zrychlení reakce a úsporu nákladů. Efektivnějším postupem však byla amino-de-alkoxylace methylového esteru kyseliny alginové za podpory mikrovlnného ohřevu.

Výsledky a výpočty

Hmotnostní výtěžek

Z 10,00 g alginátu sodného bylo získáno 8,79 g kyseliny alginové (výtěžek 88 %); z 8,00 g kyseliny alginové bylo připraveno 5,30 g metylového esteru (výtěžek 66 %). Hmotnostní výtěžek přímé amidace a amino-de-alkoxylace se pohyboval v rozpětí 50 až 120 % v závislosti na připraveném *N*-alkylamidu.

Obsah uronových kyselin (UA)

Na základě elementární analýzy (C = 29,11 % m/m) byl stanoven obsah *UA* v alginátu (80,09 % m/m); titrační metoda (Kumar a Yang, 1999) ukázala hodnotu *UA* 76,34 % m/m vypočtenou z obsahu COOH (19,52 % m/m).

Obsahy všech karboxylů $COOH_t$ (% m/m) ve výchozí kyselině alginové a obsahy volných karboxylů $COOH_f$ (% m/m) v jejich methylových esterech byly stanoveny titrační metodou a vypočteny na základě vztahu:

$$\mathrm{COOH}_{t,f} = \frac{c \cdot V \cdot 45}{m_{a,e}} \times 100,$$

kde c je přesná koncentrace titračního činidla NaOH (mol.l^{-1}), V je objem spotřebovaného roztoku NaOH; m_a a m_e jsou navážky kyseliny a esteru pro titraci (g).

Stupeň amidace (DA)

Stupeň amidace produktů vyjadřuje molární podíl amidovaných karboxylů k počtu všech karboxylů. Hodnoty *DA* (mol. %) byly vypočteny na základě výsledků organické elementární analýzy podle vzorce:

$$\mathrm{DA(kys.\ alginová)} = \frac{N \cdot 12 \cdot 6}{C \cdot n \cdot 14 - N \cdot c \cdot 12} \times 100,$$

kde N, C (% m/m) jsou obsahy dusíku a uhlíku, hodnoty n a c udávájí počet těchto atomů v molekule aminu. Výpočet je založen na domněnce podpořené FTIR analýzou, že na konci reakce jsou všechny methylové estery hydrolyzovány nebo substituovány aminem. Esterová vazba je v alkalickém prostředí nestabilní.

Výsledky elementární analýzy *N*-alkylamidů kyseliny alginové podle technického řešení jsou uvedeny v Tabulce I. V důsledku reakce vždy došlo k nalezení dusíku, jehož obsah je indikátorem amidace. V případě reakcí s *n*-dodecylaminem a *n*-oktadecylaminem byl obsah dusíku výrazně nižší v důsledku zvýšení obsahu uhlíku a vodíku navázáním dlouhého alkylu. Vzhledem k tomu, že výchozí polysacharidy dusík neobsahovaly, lze výsledky elementární analýzy použít pro kvantitativní stanovení hodnoty *DA*.

Tabulka I

Výsledky elementární analýzy a hodnoty *DA N*-alkylamidů kyseliny alginové

Amin	**Amino-de alkoxylace**				**Přímá amidace + MW**			
	Obsah (% m/m)				**Obsah (% m/m)**			
	N	***C***	***H***	***DA* (mol. %)**	***N***	***C***	***H***	***DA* (mol. %)**
n-butylamin	4,58	46,00	6,95	77,86	1,97	37,54	5,77	32,99
n-hexylamin	4,07	49,83	7,59	72,34	1,26	38,84	5,75	20,07
n-oktylamin	4,08	52,98	8,20	83,96	0,66	38,73	5,58	9,87
n-dodecylamin	2,87	54,94	8,77	57,94	0,71	39,87	5,74	11,17

n-oktadecylamin	2,62	58,11	9,12	76,55	1,04	44,43	6,85	18,95

FTIR a FT Ramanova spektroskopie

FTIR spektra jsou citlivá na stav uronových karboxylů a lze je použít pro detekci a rozlišení COO^-, COOH, esterových a amidových skupin. FT Ramanova spektra doplňují FTIR spektra a poskytují doplňující informace o daných látkách. Tak například konverze alginátu sodného na kyselinu alginovou lze potvrdit absencí pásů kolem 1615 až 1617 a 1414 až 1418 cm^{-1} (antisymetrická a symetrická valenční vibrace COO^-) a přítomností pásů kolem 2557 až 2632 cm^{-1} (valenční OH vibrace karboxylů), 1736 až 1745 cm^{-1} (valenční C=O vibrace), 1415 cm^{-1} (deformační COH vibrace) a 1247 cm^{-1} (valenční CO vibrace) (obr. 2). FTIR (Ramanova) spektra *N*-alkylamidů kyseliny alginové prokazovala snížení absorbance kolem 1730 až 1740 cm^{-1} (valenční C=O vibrace volných karboxylů a esterů) a vzniku dvou pásů při 1654 až 1670 cm^{-1} (vibrace amid I) a 1550 až 1561 cm^{-1} (vibrace amid II) (Sinitsya *et al.*, 2000). Přítomnost N-alkylových skupin byla potvrzena vibračními pásy při 2919 až 2925 cm^{-1} (asymetrická valenční vibrace CH_2), 2850 až 2856 cm^{-1} (symetrická valenční vibrace CH_2), 1466 až 1471 cm^{-1} (nůžková vibrace CH_2), 720 až 724 cm^{-1} (kyvadlová vibrace CH_2) a 535 cm^{-1} (CCC deformační vibrace). Tyto pásy byly výraznější u vysoko substituovaných produktů s n-alkylaminy obsahující dlouhý alkylový řetězec (Sinitsya et al., 2000; Synytsya *et al.*, 2003, 2004).

Průmyslová využitelnost

Reakcemi methylesteru kyseliny alginové s primárními aminy nebo přímou amidací kyseliny alginové byly připraveny nové sekundární amidy (*N*-alkylamidy). Touto chemickou modifikací polysacharidů v závislosti na struktuře alkylaminu a *DS* byly získány N-alkylamidy kyseliny alginové s velkou škálou fyzikálně chemických vlastností. Hydrofobní amidované deriváty obsahující n-alkylové skupiny (C4 až C18) jsou schopny fungovat jako sorbenty nepolárních sloučenin a tím snižovat in vivo hladinu neutrálních sterolů a triacylglycerolů.

Seznam použité literatury

1. Kumar, V.; Yang, T. Analysis of carboxyl content in oxidized celluloses by solid-state ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics* 1999, *184* (2), 219–226.

2. Marounek, M.; Volek, Z.; Synytsya, A.; Čopíková, J. Effect of pectin and amidated pectin on cholesterol homeostasis and cecal metabolism in rats fed a high-cholesterol diet. *Physiological Research* 2007, *56*, 433–442.

3. Marounek, M.; Volek, Z.; Skřivanová, E.; Tůma, J. Effect of amidated pectin alone and combined with cholestyramine on cholesterol homeostasis in rats fed a cholesterol-containing diet. *Carbohydrate Polymers* 2010a, *80*, 989–992.

4. Marounek, M.; Volek, Z.; Skrivanova, E.; Tůma, J.; Duskova, D. Comparative effect of amidated pectin and psyllium on cholesterol homeostasis in rats. *Central European Journal of Biology* 2010b, *5* (3), 299–303.

5. Marounek, M.; Volek, Z.; Dušková, D.; Tůma, J.; Taubner, T. Dose-response and long-term effect of the hypocholesterolemic effect of octadecylpectinamide in rats. *Carbohydrate Polymers* 2013, *97*, 772–775.

6. Sinitsya, A.; Čopíková, J.; Prutyanov, V.; Skoblya, S.; Machovič, V. Amidation of highly methoxylated citrus pectin with primary amines. *Carbohydrate Polymers* 2000, *42*, 359–368.

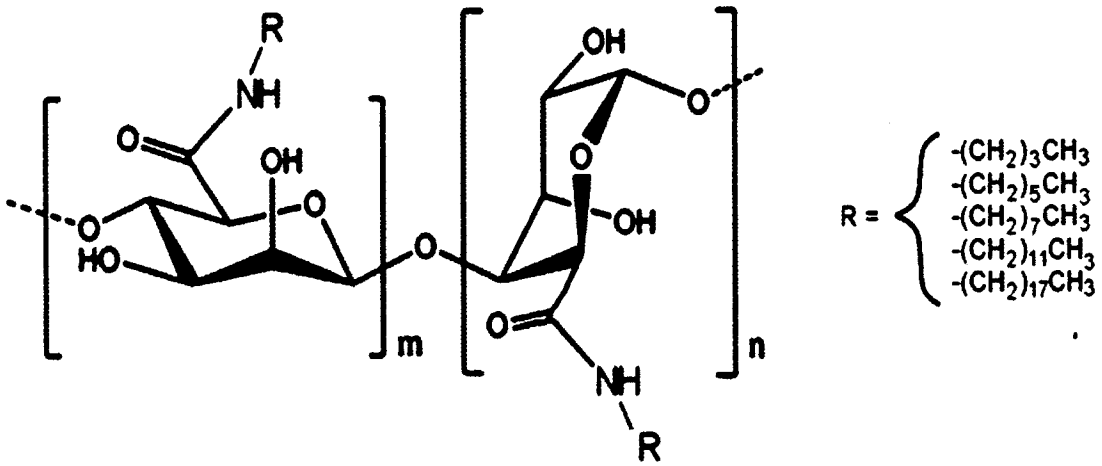
7. Synytsya, A.; Čopíková, J.; Marounek, M.; Mlčochová, P.; Sihelníková, L.; Blafková, P.; Tkadlecová, M.; Havlíček, J. Preparation of *N*-alkylamides of highly methylated citrus pectin. *Czech Journal of Food Science* 2003, *21*, 162–166.

8. Synytsya, A.; Čopíková, J.; Marounek, M.; Mlčochová, P.; Sihelníková, L.; Skoblya, S.; Havlátová, H.; Matějka, P.; Maryška, M.; Machovič, V. N-octadecylpectinamide, a hydrophobic

sorbent based on modification of highly methoxylated citrus pectin. *Carbohydrate Polymers* 2004, *56*, 169–179.

NÁROKY NA OCHRANU

1. *N*-Alkylamidy kyseliny alginové obecného vzorce (I)



(I),

ve kterém

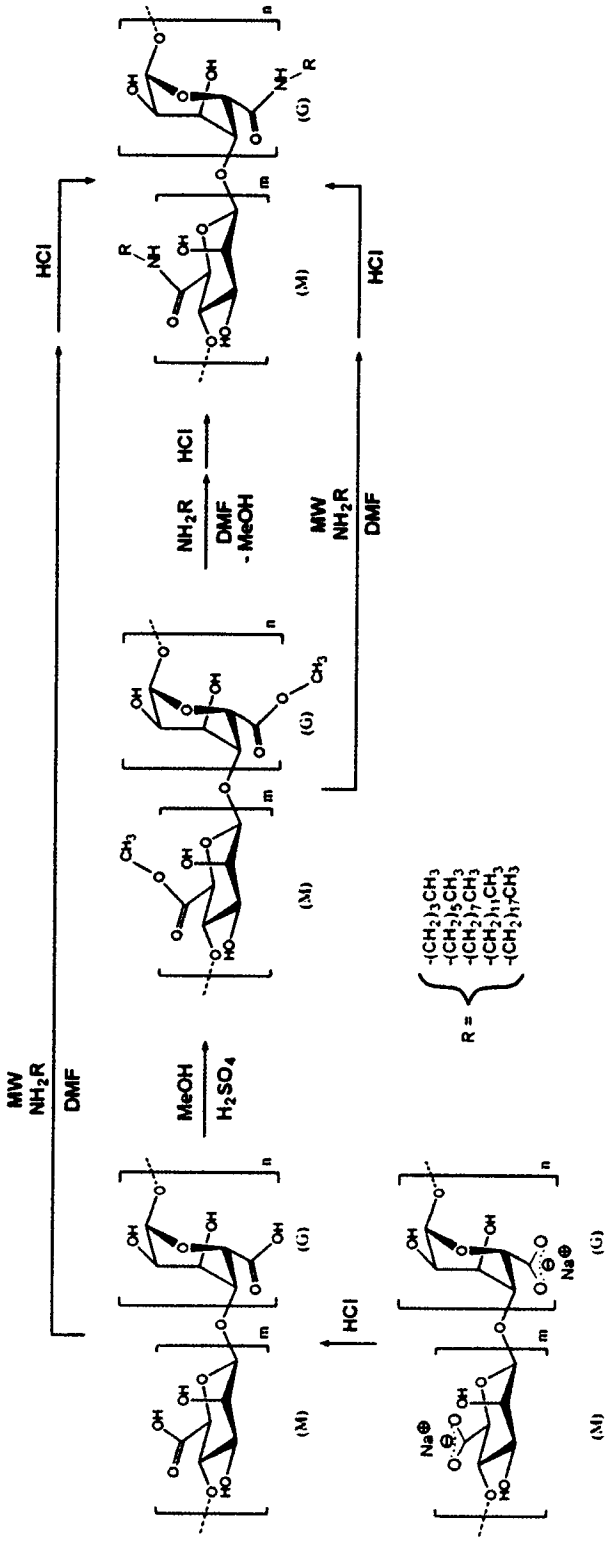
R značí butyl, hexyl, oktyl, dodecyl a oktadecyl,

m značí počet jednotek kyseliny β-D-mannuronové a je v rozmezí 25 až 1000,

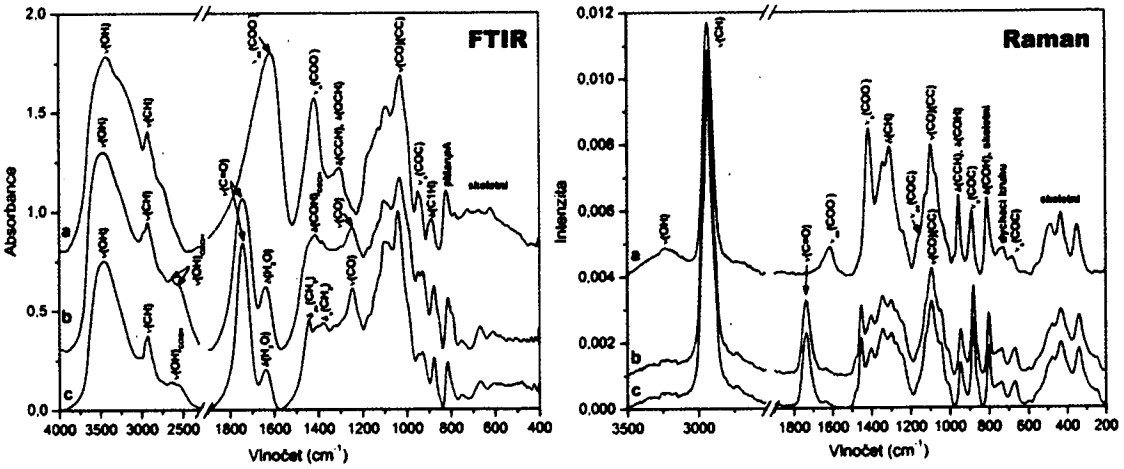
n značí počet jednotek kyseliny α-L-guluronové a je v rozmezí 25 až 1000,

přičemž poměr m:n v molekule kyseliny alginové je 1:1 při celkovém počtu jednotek kyselin v rozmezí 50 až 2000.

2 výkresy

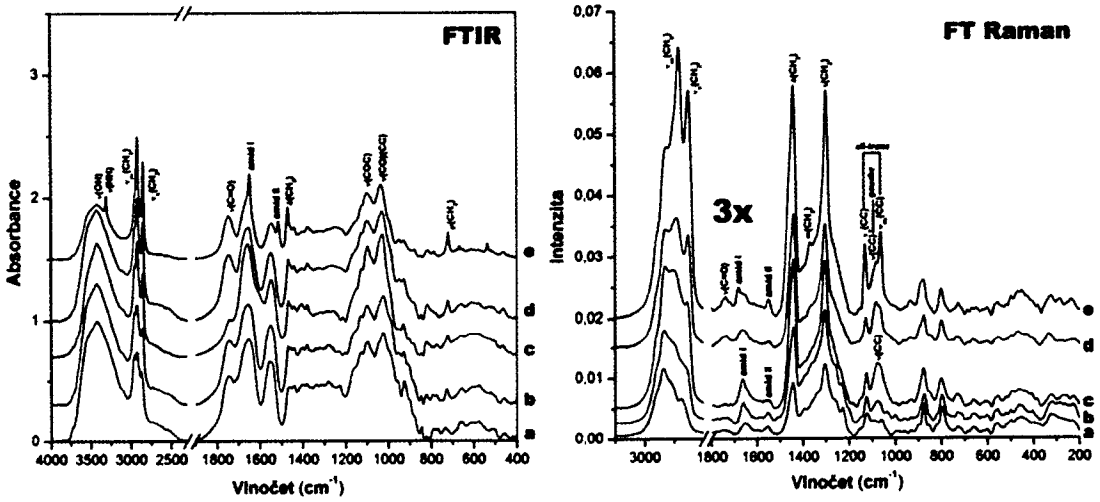

MW
NH2R
DMF
MeOH
H2SO4
HCl
NH2R
DMF
-MeOH
HCl
MW
NH2R
DMF
HCl
HCl
R =
-(CH2)3CH3
-(CH2)5CH3
-(CH2)7CH3
-(CH2)11CH3
-(CH2)13CH3
(M)
(G)
Na⊕

Obr. 1



Obr. 2

Obr. 3



Konec dokumentu