



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

51 Int. Cl.³: C 07 C 59/215
C 07 D 307/62



Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

12 FASCICULE DU BREVET A5

11

629 470

21 Numéro de la demande: 15148/77

73 Titulaire(s):
Pfizer Inc., New York/NY (US)

22 Date de dépôt: 09.12.1977

72 Inventeur(s):
Glenn Colton Andrews, Waterford/CT (US)

24 Brevet délivré le: 30.04.1982

45 Fascicule du brevet
publié le: 30.04.1982

74 Mandataire:
E. Blum & Co., Zürich

54 Procédé de préparation d'un mélange de 2-cétogulonate et de 2-cétogluconate.

57 En soumettant à une réduction l'acide 2,5-dicétogluconique, ses esters alkyliques ou ses sels à l'aide d'un borohydrure de métal alcalin, il se forme de l'acide 2-cétogulonique en même temps que de plus petites quantités d'acide 2-cétogluconique.

L'acide 2-cétogulonique est aisément transformé en acide ascorbique ou vitamine C par traitement avec un acide fort.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un mélange d'un 2-cétogulonate et d'un 2-cétogluconate, caractérisé en ce qu'on met en contact l'acide 2,5-dicétogluconique, un ester alkylque normal dudit acide dont le groupe alkyle comprend 1 à 4 atomes de carbone, ou un sel dudit acide ayant un ion complémentaire choisi entre un métal alcalin, un métal alcalino-terreux, l'ion ammonium et un ion tétraalkyl-ammonium dont chaque radical alkyle comprend 1 à 4 atomes de carbone, avec 0,8 à 1,1 équivalent par mole d'un borohydru de métal alcalin en solution à un pH supérieur à 5 et à une température comprise entre -30 et +50°C.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la mise en contact est effectuée à une température comprise entre -25 et +25°C et à un pH compris entre 6 et 10,5, et que la proportion de l'acide 2,5-dicétogluconique, de son ester ou son sel, respectivement, est comprise entre 5 et 20% en poids de la solution.

3. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que l'ion complémentaire de métal alcalin est l'ion sodium.

4. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que l'ion complémentaire de métal alcalino-terreux est l'ion calcium.

5. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le borohydru de métal alcalin est le borohydru de sodium.

6. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la mise en contact est effectuée en solution aqueuse.

7. Procédé suivant la revendication 6, caractérisée en ce que la solution aqueuse contient un cosolvant choisi entre un alcanol ayant 1 à 4 atomes de carbone, un alcanediol ayant 2 à 4 atomes de carbone, l'acétonitrile, le diméthylsulfoxyde et le diméthyl-formamide.

8. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce que le cosolvant est le méthanol.

9. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la mise en contact est effectuée en présence d'un agent complexant le bore, choisi entre le fluorure de métal alcalin, le fluorure d'ammonium et une résine d'échange ionique adsorbant le bore.

10. Procédé pour la préparation de l'acide ascorbique, caractérisé en ce qu'on effectue le procédé selon la revendication 1 et que le mélange du 2-cétogulonate et du 2-cétogluconate obtenu est mis en contact avec un acide choisi entre l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique, l'acide sulfurique et les résines d'échange d'ions sulfoniques à une température comprise entre 50 et 130°C jusqu'à ce que la lactonisation en acide ascorbique soit sensiblement achevée.

11. Procédé suivant la revendication 10, caractérisé en ce que l'acide utilisé est l'acide chlorhydrique.

12. Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en ce que la température varie entre 60 et 90°C.

La présente invention concerne un procédé de préparation d'un mélange d'un 2-cétogulonate et d'un 2-cétogluconate par réduction sélective de l'acide 2,5-dicétogluconique, de ses esters alkyliques ou de certains de ses sels. Le mélange d'acide 2-cétogulonique et d'acide 2-cétogluconique est intéressant à utiliser pour la préparation de l'acide ascorbique et de l'acide érythorbique. L'acide ascorbique ou vitamine C doit être présent dans les aliments absorbés par l'homme et c'est pourquoi il est largement utilisé, soit sous la forme de comprimés, soit par addition à des aliments. L'acide érythorbique ou acide isoascorbique est intéressant à ajouter à des aliments comme agent antioxydant.

L'acide 2,5-dicétogluconique est facile à préparer par l'action de bactéries sur le glucose, plusieurs espèces bactériennes des genres *Acetobacter* et *Pseudomonas* pouvant être utilisées à cette fin. Le brevet japonais N° 14493 (1964) décrit la préparation de cet acide par l'action de *Pseudomonas sesami*.

Les travaux antérieurs concernant la réduction au borohydru de sodium de l'acide 2,5-dicétogluconique ont été limités à la réduction totale des groupes 2-céto et 5-céto en groupes hydroxyle avec un grand excès de borohydru de sodium et on ne connaît pas de travaux portant sur la réduction stéréosélective et régiosélective non catalytique pour la préparation de l'acide 2-cétogulonique et l'acide 2-cétogluconique. Wakisaka [«Agr. Biol. Chem.», 28, 819 (1964)] effectue la réduction de l'acide 2,5-dicétogluconique dans les deux positions 2- et 5-céto par l'action de borohydru de sodium en excès. Cet auteur a indiqué que les quatre isomères formés sont l'acide D-gluconique, l'acide D-mannoïque, l'acide L-idonique et l'acide L-gulonique. La réaction d'oxydation de Ruffs du mélange obtenu de ces isomères a donné le D-arabinose et le L-xylose. Le rendement en D-arabinose obtenu a été supérieur au rendement en L-xylose, ce qui, d'après Wakisaka, pourrait provenir de la réduction stéréospécifique, de la présence d'isomères ou de transformations entre les divers isomères de structure. Le meilleur rendement en D-arabinose laisse à supposer que la réduction par l'hydrure avec formation des isomères D l'emporte sur la formation des isomères L, contrairement au procédé de la présente invention qui offre non seulement une réduction régiosélective au niveau de la position 5-céto, mais une réduction stéréosélective s'accompagnant de la formation de plus grandes quantités de l'isomère L voulu de l'acide 2-cétogulonique. La réduction complète de l'acide 2,5-dicétogluconique avec un excès de borohydru de sodium a aussi été rapportée par Katznelson dans «J. Biol. Chem.», 204, 43 (1953), cet auteur ayant obtenu un «acide gluconique» considéré comme vraisemblablement formé de quatre isomères dont les tentatives de dédoublement ont échoué. De même, la réduction complète du 2,5-dicétogluconate de calcium avec le borohydru de sodium a été décrite par Bernaerts et collaborateurs dans «Antonie van Leeuwenhoeck», 37, 185 (1971).

Wakisaka a montré, dans «Agr. Biol. Chem.» 28, 819 (1964), que la réduction à l'hydrogène de l'acide 2,5-dicétogluconique en présence d'un catalyseur consistant en nickel de Raney donne de faibles rendements en un mélange d'acide 2-cétogulonique et d'acide 2-cétogluconique dans lequel ce dernier acide constitue le composant principal. Cela est indésirable si l'on cherche à utiliser le mélange pour préparer et isoler en de forts rendements l'acide ascorbique offrant davantage d'intérêt. Pour de telles applications, il est avantageux d'utiliser un mélange contenant une proportion dominante d'acide 2-cétogulonique, attendu que cet acide est le précurseur de l'acide ascorbique, tandis que l'acide 2-cétogluconique est celui de l'acide érythorbique.

La réduction catalytique d'un 5-céto-D-gluconate avec des catalyseurs à base de métaux nobles pour produire un mélange d'un L-idonate et d'un D-gluconate est également un procédé connu. La sélectivité envers le L-idonate est favorisée par l'utilisation d'un catalyseur consistant en un borure métallique préparé par traitement d'un sel de métal noble au borohydru de sodium [voir Chen et collaborateurs, «Chem. Pharm. Bull.», 18, 1305 (1970)]. La réduction au borohydru de sodium de l'acide 5-céto-D-gluconique a aussi été décrite dans «J.A.C.S.» 76, 3543 (1954), mais elle n'est pas stéréosélective et elle donne des quantités à peu près égales d'acide D-gluconique et d'acide L-idonique.

L'invention concerne un procédé de préparation d'un mélange d'un 2-cétogulonate et d'un 2-cétogluconate, procédé qui consiste à réduire sélectivement l'acide 2,5-dicétogluconique, un ester n-alkylique de l'acide 2,5-dicétogluconique dont le groupe alkyle comprend 1 à 4 atomes de carbone ou un sel d'acide 2,5-dicétogluconique ayant un ion complémentaire choisi entre un métal alcalin, un métal alcalino-terreux, l'ammonium et un tétraalkyl-ammonium, dont les groupes alkyle comprennent 1 à 4 atomes de carbone. La réduction sélective est effectuée par mise en contact du produit de départ ci-dessus en solution à un pH supérieur à 5 avec une proportion de 0,8 à 1,1 équivalent d'un borohydru de métal alcalin par mole de 2,5-dicétogluconate, à une température de -30 à

50°C. Le mélange résultant de 2-cétogulonate et de 2-cétogluconate peut être transformé en acide ascorbique et en acide érythorbique.

On a constaté, contre toute attente, que le procédé de la présente invention permet la réduction régiosélective et stéréosélective non catalytique d'un 2,5-dicétogluconate dans la position 5-céto en un bon rendement global, en formant un mélange d'un 2-cétogulonate et d'un 2-cétogluconate. On peut faire varier le rapport des produits dans le mélange résultant entre des limites d'environ 85:15 à environ 45:55 selon les conditions et les corps réactionnels utilisés, comme on le décrira en détail dans ce qui suit. Un intérêt particulier résulte du fait que le procédé de l'invention peut donner, en un bon rendement, un mélange contenant principalement de l'acide 2-cétogulonique qui peut être transformé en un rendement convenable en l'acide ascorbique qui présente plus d'intérêt. Toutefois, des mélanges contenant des quantités à peu près égales de 2-cétogulonate et de 2-cétogluconate constituent des sources intéressantes à utiliser pour la préparation de l'acide ascorbique et de l'acide érythorbique et le procédé de l'invention offre donc l'avantage de sa souplesse en ce qui concerne la production de quantités variables d'acide ascorbique et d'acide érythorbique.

Le 2,5-dicétogluconate utilisé dans la présente invention peut être l'acide 2,5-dicétogluconique ou un sel de cet acide. Des sels convenables comprennent ceux dont les ions complémentaires consistent en un métal alcalin, un métal alcalino-terreux, l'ion ammonium ou un ion tétraalkylammonium dont les groupes alkyle comprennent 1 à 4 atomes de carbone. Il est également intéressant d'utiliser comme matières premières dans le procédé de l'invention les nouveaux esters *n*-alkyliques de l'acide 2,5-dicétogluconique dont le groupe alkyle comprend 1 à 4 atomes de carbone. Les termes 2,5-dicétogluconate, 2-cétogulonate et 2-cétogluconate utilisés dans le présent mémoire englobent les acides libres et les esters alkyliques et les sels convenables de ces acides, tels que définis ci-dessus. L'acide 2,5-dicétogluconique et ses sels peuvent être produits par tout procédé connu dans la pratique. Généralement, le 2,5-dicétogluconate est produit sous la forme du sel de calcium en solution aqueuse par fermentation, en utilisant des procédés bien connus dans le domaine des fermentations industrielles (voir par exemple le brevet japonais N° 14493), et on peut l'utiliser directement comme composé de départ pour le procédé de l'invention. Le 2,5-dicétogluconate peut aussi être produit par fermentation en présence d'autres ions tels que l'ion sodium et le 2,5-dicétogluconate de sodium résultant est de même utilisé directement comme composé de départ. Dans un procédé utilisé en variante, le 2,5-dicétogluconate est préparé de la manière classique sous la forme du 2,5-dicétogluconate de calcium et transformé en le composé désiré par addition d'un sel capable de précipiter le calcium et de laisser le 2,5-dicétogluconate en solution avec l'ion complémentaire désiré. Ainsi, par exemple, le 2,5-dicétogluconate de sodium ou d'ammonium peut être produit par addition respective de carbonate de sodium ou d'ammonium à une solution de 2,5-dicétogluconate de calcium produite par fermentation. Le calcium est précipité sous la forme de carbonate de calcium en laissant dans la solution le 2,5-dicétogluconate avec les ions complémentaires sodium ou ammonium. Les acides libres peuvent aussi être neutralisés avec l'hydroxyde ou un autre sel correspondant. Le cas échéant, le 2,5-dicétogluconate peut être isolé, purifié et redissous.

Les esters alkyliques normaux de l'acide 2,5-dicétogluconiques dont le radical alkyle comprend 1 à 4 atomes de carbone sont des composés nouveaux intéressants à utiliser comme composés de départ dans le procédé de l'invention. Les esters peuvent être préparés par chauffage d'une solution d'acide 2,5-dicétogluconique ou d'un sel convenable de cet acide dans l'alcool normal correspondant, à une température de 50 à 100°C, en présence d'une quantité catalytique d'un acide fort tel que l'acide sulfurique, chlorhydrique ou paratoluènesulfonique concentré, etc., pour former le 5,5-dialkylacétal de 2,5-dicétogluconate alkylique correspondant. Des sels convenables de l'acide 2,5-dicétogluconique comprennent les sels de métaux alcalins, de métaux alcalino-terreux, d'ammonium et de tétraalkylammonium dont chaque radical alkyle comprend 1 à

4 atomes de carbone. L'acétal est ensuite hydrolysé avec un acide aqueux à une température d'environ -10 à 30°C, pour former l'ester alkylique désiré de l'acide 2,5-dicétogluconique. Des acides convenables comprennent l'acide chlorhydrique aqueux, l'acide trifluoracétique, l'acide sulfurique, des résines échangeuses d'ions acide sulfonique, etc. Les 5,5-dialkylacétals de 2,5-dicétogluconates alkyliques intermédiaires sont également des composés nouveaux. Un acétal apprécié et un ester résultant de son hydrolyse sont respectivement le 5,5-diméthylacétal du 2,5-dicétogluconate méthylique et le 2,5-dicétogluconate de méthyle.

Si l'on utilise un 2,5-dicétogluconate de métal alcalin comme composé de départ, on donne la préférence au sel de sodium. On a trouvé que le sel de sodium est un composé de départ particulièrement avantageux pour la préparation de mélanges d'un 2-cétogulonate et d'un 2-cétogluconate renfermant le 2-cétogulonate comme produit principal, pour faciliter ainsi la synthèse de l'acide ascorbique. Un 2,5-dicétogluconate alcalino-terreux avantageux est le sel de calcium. Lorsqu'on utilise des sels de tétraalkylammonium, on donne la préférence au sel de tétraméthylammonium pour des raisons de coût et d'approvisionnement. Le 2,5-dicétogluconate méthylique est un ester alkylique avantageux à utiliser comme composé de départ.

Une solution du 2,5-dicétogluconate est mise en contact avec un borohydrure de métal alcalin. La réaction est de préférence conduite en solution aqueuse contenant éventuellement des cosolvants organiques tels que, par exemple, des alcanols ayant 1 à 4 atomes de carbone, des alcanediols ayant 2 à 4 atomes de carbone, l'acétone-trile, le diméthylsulfoxyde et le diméthylformamide. Le méthanol est un cosolvant de choix. La concentration du 2,5-dicétogluconate n'est pas déterminante, mais elle varie avantageusement de 5 à 20% en poids. La concentration du 2,5-dicétogluconate formé par fermentation se situe généralement dans cette plage, et cela constitue donc une solution aqueuse avantageuse à utiliser comme matière première dans le procédé de l'invention. Lorsqu'un ester alkylique est utilisé comme composé de départ, on peut conduire la réaction dans des solvants anhydres tels que des alcanols, notamment le méthanol, ainsi que le diméthylsulfoxyde et le diméthylformamide. Il n'est jamais nécessaire que le 2,5-dicétogluconate soit entièrement dissous dans le solvant, pourvu qu'une partie importante du composé de départ se trouve en solution.

Le borohydrure de métal alcalin peut être utilisé en solution ou sous la forme solide. Le borohydrure le plus avantageux à utiliser dans le procédé de l'invention est le borohydrure de sodium. On a constaté que l'utilisation du composé de sodium, notamment lorsque le substrat est le 2,5-dicétogluconate de sodium, a pour effet que le mélange de produits renferme de fortes proportions de 2-cétogulonate. On a observé que, lorsqu'on utilise des borohydrures d'autres métaux alcalins, on obtient des quantités un peu plus faibles de 2-cétogulonate et que, en choisissant les corps réactionnels, on peut produire des mélanges renfermant le 2-cétogulonate et le 2-cétogluconate dans des rapports de 85:15 à 45:55. On dispose ainsi d'une certaine souplesse d'utilisation de ces mélanges pour la production soit d'acide ascorbique soit d'acide érythorbique.

On peut obtenir de bons rendements en un mélange d'un 2-cétogulonate et d'un 2-cétogluconate en utilisant environ 0,8 à 1,1 équivalent du borohydrure de métal alcalin par mole de 2,5-dicétogluconate. On entend désigner par équivalent de borohydrure de métal alcalin la quantité stoechiométrique nécessaire pour transformer le groupe 5-céto du 2,5-dicétogluconate en groupe hydroxyle. On peut aussi exprimer cette quantité par 0,8 à 1,1 équivalent d'ion hydrure. 1 mol d'un borohydrure de métal alcalin contient 4 équivalents d'ion hydrure et la quantité de réactif qui est requise peut en conséquence être exprimée par une proportion de 0,200 à 0,275 mol du borohydrure de métal alcalin. Il y a lieu de remarquer que le borohydrure de métal alcalin pourrait être utilisé en quantités inférieures à 0,8 équivalent/mol de 2,5-dicétogluconate pour permettre la réduction sélective du 2,5-dicétogluconate. Toutefois, dans ce cas, le rendement en mélange des 2-cétoacides est d'autant plus

réduit. Le procédé de l'invention est axé sur l'obtention du rendement global optimal en le mélange désiré de produits. Il y a lieu de remarquer que le présent mémoire couvre également la mise en œuvre du procédé de l'invention avec réaction d'une partie seulement du 2,5-dicétogluconate, le composé de départ n'ayant pas réagi pouvant ensuite être recyclé en vue d'une réaction ultérieure.

Au cours de la réaction du 2,5-dicétogluconate avec le borohydru de métal alcalin, le pH de la solution doit être maintenu à une valeur supérieure à 5, de préférence entre 6 et 10,5. Lorsque l'acide 2,5-dicétogluconique est utilisé comme composé de départ, le pH doit être ajusté à une valeur supérieure à 5 avant l'addition du borohydru de métal alcalin. Le pH d'une solution aqueuse de 2,5-dicétogluconate de sodium ou de calcium produit par fermentation est habituellement inférieur à 5 et ce pH doit de même être ajusté à une valeur supérieure à 5 avant l'addition du borohydru. On peut l'ajuster par l'addition d'une base quelconque, mais on utilise de préférence un composé sodique tel que le carbonate de sodium ou l'hydroxyde de sodium. A titre de variante, on peut ajuster le pH en même temps que l'on ajoute le borohydru, par dissolution de ce dernier dans une solution basique, par exemple d'hydroxyde de sodium, en sorte que, lorsqu'on ajoute la solution basique de borohydru, le pH de la solution aqueuse s'ajuste spontanément à une valeur supérieure à 5. Dans ce cas, on doit tenir compte de la faible quantité de borohydru qui est décomposée par l'acidité avant que le pH ne soit ajusté à une valeur supérieure à 5, par l'addition d'un léger excès par rapport à la quantité stoechiométriquement requise. Le borohydru peut être ajouté lentement par portions réparties dans un intervalle de temps, par exemple par addition goutte à goutte de la solution basique du borohydru à la solution du 2,5-dicétogluconate sous agitation. De préférence, le borohydru est ajouté en une seule fois au début de la réaction, à une température inférieure à 25°C.

La réduction peut aussi être effectuée dans un réacteur à écoulement, dans le cas général où une solution du borohydru de métal alcalin est mélangée avec le courant renfermant le 2,5-dicétogluconate ou est injectée dans ce courant.

Le temps nécessaire à l'accomplissement de la réduction dépend de la température de la réaction et de la vitesse d'addition du borohydru au 2,5-dicétogluconate; généralement, les durées de réaction sont relativement courtes et la réaction est achevée en des durées d'environ 10 min à environ 2 h.

Pendant l'addition du borohydru de métal alcalin, la température de la solution aqueuse doit être maintenue à une valeur de -30 à 50°C et, de préférence, de -25 à +25°C. Au-dessus de 50°C, il y a un risque de décomposition des corps réactionnels.

La réaction de réduction peut avantageusement être conduite en présence d'un agent complexant le bore, qui est dissous ou dispersé dans le milieu réactionnel. De l'acide borique est produit dans la réaction de réduction et cet acide peut se complexer avec le 2,5-dicétogluconate utilisé comme composé de départ. On entend désigner par agent complexant le bore tout composé ou toute substance capable d'inhiber ou de prévenir la complexation de l'acide borique et du 2,5-dicétogluconate, par exemple par réaction préférentielle avec l'acide borique ou adsorption de cet acide, sans perturber le cours de la réaction. Des exemples convenables d'agents de complexation du bore comprennent des fluorures de métaux alcalins, le fluorure d'ammonium et des résines échangeuses d'ions adsorbant le bore. Plusieurs de ces résines sont disponibles dans le commerce. Une résine de ce type particulièrement avantageuse à utiliser est la résine Amberlite XE-243 (Rohm and Haas Company, Philadelphie, PA). L'agent complexant le bore doit être présent en quantités suffisantes pour complexer l'acide borique qui est produit. Par conséquent, on doit utiliser environ 4 mol de fluorure pour chaque mole de borohydru de sodium impliquée dans la réduction. La quantité de résine échangeuse d'ions que l'on utilise varie habituellement d'environ 0,5 à 1 volume de résine par volume de solution de 2,5-dicétogluconate dans un procédé discontinu, mais la

quantité utilisée varie nécessairement en fonction de la résine particulière et des conditions réactionnelles du procédé.

Lorsque la réduction sélective avec formation d'un mélange d'un 2-cétogulonate et d'un 2-cétogluconate est achevée, le 2,5-dicétogluconate qui n'a pas réagi peut être recyclé en vue de sa réaction ultérieure, ou bien on peut l'éliminer efficacement par chauffage avec un acide ou avec une base. Si l'on désire soumettre le 2,5-dicétogluconate n'ayant pas réagi à des réactions ultérieures de réduction, la réduction initiale est de préférence conduite en présence d'un agent complexant le bore, comme décrit ci-dessus.

Le mélange d'acides 2-cétogulonique et 2-cétogluconique peut être isolé par filtration du mélange réactionnel et réglage du pH du filtrat à une valeur de 1,5 à 2 par l'addition d'acides tels que l'acide sulfurique concentré, puis séparation par filtration de tout précipité formé, qui est ensuite jeté. On peut recueillir les acides 2-cétogulonique et 2-cétogluconique en éliminant l'eau ou le mélange d'eau et de cosolvant organique, par exemple par lyophilisation. On peut déterminer le rapport de l'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique dans le mélange par une chromatographie en phase liquide des esters méthyliques en utilisant un mélange d'acide borique (0,6M) et de formiate d'ammonium (0,4M) dans l'eau comme phase mobile; et une résine Aminex type A-25 (marque déposée de la firme Biorad Laboratories, Richmond, CA) en particules de 0,149 à 0,297 mm comme phase stationnaire, ou bien par chromatographie sur couche mince en utilisant un support cellulosique.

Le mélange d'acide 2-cétogulonique et d'acide 2-cétogluconique est facile à transformer en acide ascorbique et en acide érythorbique. Le mélange de 2-cétoacides peut être transformé en esters méthyliques par chauffage au reflux dans du méthanol en présence d'un catalyseur acide tel que l'acide chlorhydrique ou d'une résine d'échange d'ions sulfoniques pendant 3 à 24 h. D'autres esters peuvent être formés de la sorte lorsqu'on utilise l'alcool correspondant. Les esters sont formés directement lorsqu'un ester alkylique d'acide 2-dicétogluconique constitue le composé de départ, pour la réduction sélective. Le mélange d'esters méthyliques peut être séparé et il est ensuite chauffé au reflux dans du méthanol en présence d'une base telle que le bicarbonate de sodium, en atmosphère inerte. Pendant le refroidissement, l'ascorbate de sodium et l'érythorbate de sodium précipitent. Les sels bruts sont recueillis par filtration, mélangés avec de l'eau et désionisés avec une résine d'échange cationique telle que la résine Dowex 50 de la firme Dow Chemical Co. L'eau est éliminée et les acides ascorbique et érythorbique sont recristallisés dans un mélange de méthanol et d'eau en donnant un mélange d'acide ascorbique et d'acide érythorbique. Le cas échéant, l'acide ascorbique peut être obtenu par recristallisation dans une solution de méthanol et d'eau à 4:1. D'autres solvants ou cosolvants convenables peuvent être utilisés le cas échéant. Les esters méthyliques des acides 2-cétogulonique et 2-cétogluconique peuvent avantageusement être séparés et transformés en acide ascorbique et respectivement en acide érythorbique dans les mêmes conditions que celles définies ci-dessus pour le mélange d'esters.

Dans une variante appréciée, l'acide ascorbique peut être préparé sélectivement à partir d'un mélange d'acide 2-cétogulonique et d'acide 2-cétogluconique. Cela est particulièrement avantageux lorsque le mélange contenant une forte proportion d'acide 2-cétogulonique a été formé, par exemple, par réduction au borohydru de sodium du 2,5-dicétogluconate de sodium. Le mélange d'acides obtenu par réduction au borohydru est chauffé dans un solvant organique convenable tel que le xylène à environ 50-120°C et de préférence à 60-90°C en présence d'un acide choisi entre l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique, l'acide sulfurique et des résines d'échange d'ions sulfoniques. L'acide chlorhydrique constitue l'acide de choix. Après chauffage pendant 3 à 12 h, selon la température que l'on utilise, la lactonisation de l'acide 2-cétogulonique en acide ascorbique est sensiblement terminée. Dans ce procédé, il n'est pas produit d'acide érythorbique et il s'agit donc d'un procédé simple de formation sélective d'acide ascorbique à partir de mélanges d'acide 2-cétogulonique et d'acide 2-cétogluconique produits par la réduc-

tion au borohydrure d'un 2,5-dicétogluconate. Cette lactonisation catalysée par un acide peut aussi être appliquée à la transformation de mélange des esters alkyliques de l'acide 2-cétogulonique et de l'acide 2-cétogluconique en acide ascorbique.

L'invention est illustrée par les exemples suivants, donnés à titre non limitatif.

Exemple 1:

On ajoute 42,4 ml de borohydrure de sodium 2,2M dans de l'hydroxyde de sodium 7M (0,93M de H) à un débit de 1 ml/min à une solution sous agitation rapide de 20 l de bouillon de fermentation brut filtré contenant 10% de 2,5-dicétogluconate de calcium ($C_6H_8O_7 \cdot 1,5H_2O$; poids moléculaire 238; 0,84M) à 0° (bain de glace et d'eau). Le pH de la solution croît rapidement de 3,65 à 10,2. La suspension résultante est filtrée, le pH du filtrat est ajusté à 1,6 par addition d'acide sulfurique concentré et le précipité résultant est séparé par filtration et jeté. En éliminant l'eau par lyophilisation, on obtient 246 g de matière solide lyophilisée. Une portion de cette substance est estérifiée et l'analyse par chromatographie en phase liquide en présence d'un étalon interne donne un rapport acide 2-cétogulonique/2-cétogluconique de 78/22, avec un rendement global de 79%.

Une solution de 10 g des acides 2-cétogulonique et 2-cétogluconique lyophilisés obtenus dans la réduction ci-dessus dans 50 ml de méthanol est traitée avec 1 g de résine Dowex 50 (marque déposée d'une résine de la firme Dow Chemical Co.) et le mélange est chauffé au reflux pendant 12 h. Après refroidissement, la résine est enlevée par filtration et les esters méthyliques bruts sont isolés sous la forme d'une huile par élimination du solvant.

Le mélange brut d'esters méthyliques obtenu ci-dessus est ajouté à du méthanol contenant 1,5 équivalent de bicarbonate de sodium et le tout est chauffé au reflux sous atmosphère d'azote pendant 6 h. Les sels de sodium de l'acide ascorbique et de l'acide érythorbique précipitent dans la solution lors du refroidissement. Les sels bruts sont isolés par filtration, placés dans l'eau et désionisés à l'aide d'une résine d'échange cationique Dowex 50. Après élimination de l'eau, on fait cristalliser le résidu brut d'acide ascorbique et d'acide érythorbique dans un mélange de méthanol et d'eau et on obtient un mélange des acides ascorbique et érythorbique. Par recristallisation dans un mélange de méthanol et d'eau à 4:1, on obtient l'acide ascorbique.

Exemple 2:

On ajuste le pH d'une solution aqueuse à 10% de 2,5-dicétogluconate de sodium à 6,1 par addition de carbonate de sodium, on ajoute du méthanol jusqu'à ce que la proportion en volume de cet alcool soit de 50% et on refroidit la solution à une température de -15 à -25°C. On ajoute un équivalent de borohydrure de sodium à la solution refroidie que l'on agite pendant 6 h à une température de -15 à -25°C et pendant environ 16 h à la température ambiante. On isole un mélange de 2-cétogulonate de sodium et de 2-cétogluconate de sodium par précipitation au méthanol et filtration. L'analyse des esters méthyliques par chromatographie en phase liquide donne un rapport de l'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique de 78:22 dans le mélange de produits.

Exemple 3:

En suivant le mode opératoire de l'exemple 2, on conduit la réduction au borohydrure de sodium du 2,5-dicétogluconate de calcium à 0°C et à différentes valeurs de pH. Les mélanges de 2-cétogulonate et de 2-cétogluconate formés sont analysés par chromatographie en phase liquide pour déterminer le rapport de l'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique. Les résultats obtenus sont les suivants:

pH	Solvant	Rapport de l'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique
6,37	Eau:méthanol ^a	69:31
8,23	Eau:méthanol	68:32
8,65	Eau	45:55

^a 1:1 en volume.

Exemple 4:

En suivant le mode opératoire de l'exemple 2, on conduit une réduction du 2,5-dicétogluconate de sodium au borohydrure de sodium dans une solution d'eau et de méthanol à 1:1 en volume, maintenue à une température de -15 à -20°C à des pH différents. Les mélanges de 2-cétogulonate et de 2-cétogluconate formés sont analysés par chromatographie en phase liquide de manière à déterminer le rapport de l'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique. Les résultats obtenus sont les suivants:

pH	Rapport de l'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique
6,10	78:22
8,60	77:23
8,80	77:23
10,20	71:29

Exemple 5:

En suivant le mode opératoire de l'exemple 2, on conduit la réduction au borohydrure de sodium du 2,5-dicétogluconate de sodium dans une solution d'eau et de méthanol à un pH de 7,9 à 8,6, à différentes températures. Les rapports de l'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique dans les produits résultants sont déterminés par chromatographie en phase liquide. Les résultats obtenus sont les suivants:

Température (°C)	Rapport de l'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique
24	77:23
0	80:20
-15 à -20	77:23

Exemple 6:

En suivant le mode opératoire de l'exemple 2, on conduit la réduction au borohydrure de sodium du 2,5-dicétogluconate de sodium dans l'eau à 0°C et à un pH égal à 8, avec des concentrations variables de 2,5-dicétogluconate de sodium. Les rapports de l'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique dans les produits résultants sont déterminés par chromatographie en phase liquide. Les résultats obtenus sont les suivants:

Concentration en 2,5-dicétogluconate de sodium (% en poids)	Rapport de l'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique
5	75:25
10	79:21
20	56:44

Exemple 7:

On conduit la réaction de réduction en utilisant différents borohydrures de métaux alcalins et des 2,5-dicétogluconates portant

des ions complémentaires différents. Les rapports de l'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique dans les mélanges résul-

tants sont déterminés par chromatographie en phase liquide. Les conditions réactionnelles et les résultats obtenus sont les suivants:

Ion borohydrure	2,5-dicéto-gluconate	Température (°C)	pH	Rapport de l'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique
Li	Li	-15 à -20	8,26	48:52
Na	Li	-15 à -20	8,06	63:37
Na	Na	-15 à -20	8,60	77:23
Na	K	-15 à -20	8,08	64:36
K	K	-15 à -20	7,97	67:33
Na	Me4N	-15 à -20	8,61	63:37
Na	Ca	0	8,65	45:55
Li	Li	0	8,0	48:52
Li	Na	0	8,0	47:53
Na	Li	0	8,0	63:37
Na	Na	0	8,0	79:21

Exemple 8:

La réduction du 2,5-dicétogluconate de calcium avec du borohydrure de sodium 4,4M dans de l'hydroxyde de sodium 14M a été conduite à 0°C dans de l'eau contenant divers cosolvants. Les

rapports de l'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique dans les mélanges résultants ont été déterminés par chromatographie en phase liquide. Les résultats obtenus sont les suivants:

Cosolvant	Rapport eau:cosolvant	Rapport de l'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique
Ethylèneglycol	6:1	72:28
Acétonitrile	4:1	76:24
Diméthylformamide	4:1	72:28
Diméthylsulfoxyde	6:1	71:29
Néant	—	77:23

Exemple 9:

On dissout 15 g de 2,5-dicétogluconate de calcium isolé dans 150 ml d'eau et on ajoute 6,61 g de carbonate de sodium à 0°C en agitant la solution. Le pH de cette dernière s'élève à 9,57. On ajoute à la solution 0,49 g de borohydrure de sodium, à 0°C. Après agitation pendant 15 min, on filtre le mélange et on fait passer le filtrat sur une résine d'échange d'ions acides. Après lyophilisation et formation des esters méthyliques comme indiqué dans l'exemple 1, l'analyse chromatographique en phase liquide donne un rapport d'acide 2-cétogulonique à l'acide 2-cétogluconique de 85:15.

Exemple 10:

Cet exemple illustre un procédé avantageux de formation de l'acide ascorbique.

On charge dans un ballon réactionnel 10 g d'un mélange à 80:20 d'acide 2-cétogulonique et d'acide 2-cétogluconique. On ajoute à ce mélange 15 ml de xylène et 2 ml d'acide chlorhydrique concentré, puis on le chauffe à 65°C pendant 5 h, tout en l'agitant énergiquement. L'acide ascorbique peut être isolé du mélange réactionnel et purifié par recristallisation.

Exemple 11:

On ajoute 0,8 ml d'hydroxyde de sodium à 10% à 50 ml de 2,5-dicétogulonate de sodium à 20% à 0°C pour ajuster le pH à 5,15-9,70. On ajoute immédiatement du borohydrure de sodium en poudre (11,26 mmol; Alfa Products, Danvers, MA 01923). Le pH étant égal à 10,60 au bout de 10 min, on l'ajuste à 7 par addition d'acide sulfurique concentré. L'analyse du mélange réduit par chromatographie en phase liquide sous haute pression (résine

40 Aminex A-25, élution avec $\text{NH}_4^+ \text{HCO}_3^-$ 0,5M) révèle la réduction nette en un mélange de 2-cétogulonate de sodium et de 2-cétogluconate de sodium en un rendement de 85%.

Pour déterminer le rapport du 2-cétogulonate au 2-cétogluconate, on estérifie la substance solide lyophilisée venant de 5 ml du mélange 45 réduit, en utilisant 15 ml de méthanol et 0,275 ml d'acide sulfurique concentré. L'ester méthylique obtenu est analysé par chromatographie en phase gazeuse sous la forme de son dérivé persilylé [préparé par traitement au produit Tri-Sil/TBT (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 61105)]. La séparation sur une colonne à 3% de OV-50 210 à 135°C (vitesse d'écoulement de 30 ml/min) donne un rapport du 2-cétogulonate de méthyle au 2-cétogluconate de méthyle de 85:15.

Exemple 12:

On introduit dans un ballon à fond rond à trois tubulures, de 11 55 de capacité, équipé d'un tube de dégagement d'azote, d'un condenseur à reflux et d'un agitateur mécanique, 100 g (0,42 mol) de sel de calcium d'acide 2,5-dicétogluconique trihydraté, 800 ml de méthanol et 37 ml (0,84 mol) d'acide sulfurique concentré. On agite le mélange au reflux pendant environ 16 h. Après refroidissement de ce mélange 60 à la température ambiante, on le filtre pour enlever le sulfate de calcium précipité et on le fait passer sur 500 ml de résine Amberlyst A-21 d'échange d'ions faiblement basiques (Rohm and Haas, Philadelphia, PA). Après élimination du solvant du filtrat de couleur jaune pâle, un composé cristallin précipite dans la solution. Le résidu filtré 65 est lavé au méthanol froid; on obtient ainsi 24,6 g (23%) du 5,5-diméthylacétal de 2,5-dicétogluconate de méthyle fondant à 170-172°C;

$$[\alpha]_D = 37,97^\circ$$

($l = 1 \text{ cm}, \text{H}_2\text{O}$); spectre de masse m/e (70 eV) 203, 191, 175, 161, 157, 143, 133; spectre infrarouge (KBr) cm^{-1} 1754 ($\text{C} = \text{O}$), 3333 (OH); résonance magnétique nucléaire (DMSO-d_6) δ_{H} 6,55 (singulet 1, OH) 4,64 (doublets 2, $-\text{OH}$) 3,68 (singulet 3,



3,33 et 3,22 (singulets, 6, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{C}-$); résonance magnétique nucléaire (DMSO-d_6) δ_{c} 170,71 (singulet, 1,



98,46 (singulet, 1, anomère), 97,17 (singulet, 1, anomère) 74,59 (doublet, 1, $-\text{C}-\text{OH}$), 72,60 (doublet, 1, $-\text{C}-\text{OH}$), 60,90 (triplet, 1, $-\text{CH}_2-\text{O}$), 53,96 (quadruplet, 1, $\text{CH}_3\text{O}-$), 49,73 (quadruplet, 1, CH_3-O), 52,02 (quadruplet, 1, $\text{CH}_3-\text{O}-$).

Analyse pour $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_8$:

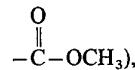
Calculé: C 42,86 H 6,39%

Trouvé: C 43,13 H 6,09%

Exemple 13:

On introduit dans un ballon à fond rond à trois tubulures de 2 l de capacité, équipé d'un tube de départ d'azote, d'un extracteur de Soxhlet et d'un agitateur mécanique, 28 g (112 mmol) de 2,5-dicétogluconate de sodium lyophilisé, 1300 ml de méthanol et 5 ml (90 mmol) d'acide sulfurique concentré. On fait refluer le mélange pendant 11,5 h. On condense les vapeurs méthanoliques, puis on les fait passer sur 20 g de tamis moléculaire Linde N° 4A (Union Carbide Corp.) dans une cartouche d'extraction de Soxhlet et on les renvoie au mélange réactionnel. Après refroidissement à la température ambiante, on filtre le mélange pour enlever le sulfate de sodium précipité et on le fait passer sur 200 ml de résine d'échange d'ions faiblement basiques Amberlyst A-21 (Rohm & Haas, Philadelphie, PA 19105). Un traitement au charbon décolorant suivi d'une filtration donne un filtrat orangé clair, qui donne, par concentration sous vide, un composé cristallin de couleur blanche. On recueille la substance solide et on la lave au méthanol froid, ce qui donne 7,0 g (24%) de 5,5-diméthylacétal de 2,5-dicétogluconate méthylique identique par sa composition à celui que l'on obtient à partir du sel de calcium de l'acide 2,5-dicétogluconique, comme décrit dans l'exemple 12.

Dans quelques cas, on a constaté que le précipité cristallin blanc consistait en un mélange du 5,5-diméthylacétal désiré et de coméate de méthyle. Résonance magnétique nucléaire du 5,5-diméthylacétal de 2,5-dicétogluconate de méthyle ($\text{DMSO-}\delta_6$): 3,68 (singulet, 3,



3,65 (singulet, 2, $-\text{CH}_2-$), 3,51 (doublet, 2,



$J = 2 \text{ Hz}$), 3,33 (singulet, 3, $-\text{OCH}_3$) et 3,22 (singulet, 3, $-\text{OCH}_3$); coméate de méthyle ($\text{DMSO-}\delta_6$): δ_{H} 8,19 (singulet, 1, $-\text{H}$) 6,98 (singulet, 1, $-\text{H}$) et 3,86 (singulet, 3, $-\text{C}-\text{OCH}_3$). Le coméate de méthyle peut être éliminé par élution fractionnée sur une colonne de résine Amberlyst A-21; le coméate de méthyle élue en dernier lorsqu'on utilise le méthanol.

Exemple 14:

On charge dans un ballon à fond rond de 250 ml 5,0 g (19,8 mol) de 5,5-diméthylacétal de 2,5-dicétogluconate de méthyle, 150 ml d'eau et 3 ml d'acide chlorhydrique 6N, on agite la charge à 80°C pendant 45 min, on la refroidit, puis on fait passer la solution aqueuse sur une colonne contenant 40 ml de résine d'échange ionique

Amberlyst A-21 (Rohm and Haas Co., Philadelphie, PA). L'éluant neutralisé est ensuite lyophilisé en donnant 2,2 g (100%) de 2,5-dicétogluconate de méthyle sous la forme d'une poudre jaune instable friable, homogène d'après l'analyse par chromatographie en phase liquide sous haute pression (résine Aminex A-25, éluant = $\text{NH}_4^+ \text{NCO}_2^-$ 0,5M). Spectre infrarouge (KBr) cm^{-1} 3330 (singulet, OH), 1736 ($\text{singulet, ester méthylique}$); résonance magnétique nucléaire (D_2O) δ_{c} 170,00 ($\text{singulet, carbone de l'ester}$), 96,86 et 92,84 ($\text{singulets, anomère}$), 73,20 et 71,50 (doublets, $-\text{CH}-\text{OH}$), 65,99 ($\text{triplet, }-\text{CH}_2-\text{O}-$), 53,95 ($\text{quadruplet, }-\text{CH}_3-\text{O}$).

Exemple 15:

Un échantillon de 500 mg (1,98 mol) de 5,5-diméthylacétal de 2,5-dicétogluconate méthylique, chargé avec 5 ml d'un mélange à 95:5 d'acide trifluoracétique et d'eau, est agité pendant 5 min sous atmosphère d'azote à la température ambiante. Le mélange d'acide trifluoracétique et d'eau est passé par évaporation sous vide en 20 min. Le 2,5-dicétogluconate de méthyle est isolé sous la forme d'une substance solide blanche en un rendement de 100%; l'analyse par chromatographie en couche mince sous haute pression montre que ce composé est homogène (résine Aminex A-25, éluant = $\text{NH}_4^+ \text{HCO}_2^-$ 0,5M).

Exemple 16:

On place le produit de l'exemple 14 dans 150 ml d'eau, on refroidit le mélange à 0°C et on ajoute le pH à 7,5 par addition d'hydroxyde de sodium 1N. On ajoute au mélange, sous agitation énergique, 215 mg de borohydre de sodium. Au bout de 1 min, on fait passer le mélange sur une colonne d'échange ionique de 40 ml contenant 50% de résine Dowex 50 et 50% de résine Amberlyst A-21. On concentre le filtrat sous vide en un mélange solide (3,7 g) de 2-cétogulonate de méthyle et de 2-cétogluconate de méthyle. On place la substance solide brute dans 50 ml d'éthanol à 95% contenant également 5,99 g de bicarbonate de sodium et on fait refluer le mélange pendant 4 h sous atmosphère d'azote. Après refroidissement, le mélange réactionnel est désionisé avec un excès de résine Dowex 50, puis concentré sous vide en donnant une huile jaune. L'analyse chromatographique en phase gazeuse et liquide du mélange réactionnel pertriméthylsilylé (150°, colonne OV-210 d'environ 1,50 m) donne un rapport de l'acide ascorbique à l'acide érythorbique de 78:22 avec un rendement global de 20% d'après le titrage à l'iode.

Exemple 17:

On ajoute 45 ml de résine d'échange ionique Amberlite XE-243 (Rohm & Haas, Philadelphie, PA 19105) à 50 ml de solution aqueuse à 12% de 2,5-dicétogluconate de sodium (28,04 mmol). On agite le mélange à 0°C au bain d'eau et de glace. Par addition goutte à goutte d'hydroxyde de sodium à 10%, on ajuste le pH à 10,8. Un traitement avec 0,265 g de borohydre de sodium (7,01 mmol, Alfa Products, Danvers, MA 01923) pendant 10 min est suivi d'un réglage du pH à 7 par addition d'acide sulfurique concentré. Après agitation pendant 0,5 h, on obtient par filtration de la résine un mélange réduit duquel environ 50% du bore initialement présent ont été éliminés. On obtient en un rendement de 90% un mélange à 85:15 d'acide 2-cétogulonique et d'acide 2-cétogluconique.

Exemple 18:

On ajoute 35 ml de résine d'échange ionique Amberlite XE-243 (Rohm & Haas, Philadelphie, PA 19105) à 50 ml de solution aqueuse à 12% de sel de sodium de l'acide 2,5-dicétogluconique (28,04 mmol). On agite le mélange à 0°C au bain d'eau et de glace. On ajuste le pH à 10,8 par addition goutte à goutte d'hydroxyde de sodium à 10%. Par addition de 0,212 g de borohydre de sodium (5,61 mmol, Alfa Products, Danvers, MA 01923), on observe une montée du pH à 11,55. Au bout de 10 min, on désactive le mélange par addition d'acide sulfurique concentré pour ajuster le pH de 11,2 à

7. Après agitation pendant 0,5 h, on filtre le mélange partiellement réduit pour enlever la résine.

On ajoute encore 10 ml de résine Amberlite XE-243 à la solution partiellement réduite. Après avoir ramené la température à 0°C par un refroidissement, on ajuste le pH de la solution à 10,8 par addition d'hydroxyde de sodium à 10%. On ajoute encore 53 mg (1,40 mmol) de borohydrure de sodium. Au bout de 10 min, on ajoute de l'acide sulfurique concentré pour ajuster le pH à 7. Après agitation pendant 0,25 h, on filtre le mélange. L'analyse par chromatographie en phase liquide sous haute pression montre la réduction totale du 2,5-dicétogluconate de sodium en 2-cétogulonate de sodium et en 2-cétogluconate de sodium. On observe une très faible quantité d'acide borique ou des produits éventuels de sur-réduction. Par un titrage chromatographique en phase liquide sous haute pression en utilisant la 2-imidazolidone comme étalon interne, on détermine un rendement de 96% en un mélange de 85:15 d'acide 2-cétogulonique et d'acide 2-cétogluconique.

Exemple 19:

On ajoute 2,355 g (56,08 mmol) de fluorure de sodium sous agitation énergique à une solution aqueuse à 12% de 2,5-dicétogluconate de sodium (28,04 mmol), refroidie à 0°C au bain d'eau et de glace. Par addition goutte à goutte d'hydroxyde de sodium à 10%, on ajuste le pH de 4,3 à 10,8. 10 min après l'addition de 0,530 g de borohydrure de sodium (14,02 mmol, Alfa Products, Danvers, MA 01923), on ajuste le pH à 7 par addition d'acide sulfurique concentré. L'analyse par chromatographie en phase liquide sous haute pression (résine Aminex A-25, éluant = NH_4^+

HCO_3^- 0,5M) révèle la présence d'une moins grande quantité de bore que lorsque la résine est absente. En agitant le mélange réactionnel pendant environ 16 h, on précipite une petite quantité d'une matière solide blanche qu'on sépare par filtration. On détermine le rendement en un mélange 85:15 d'acide 2-cétogulonique et d'acide 2-cétogluconique de 90%.

Exemple 20:

On ajoute 12,7 mmol de borohydrure de sodium en 15 min à une solution sous agitation rapide de 55 mmol de sel de sodium d'acide 2,5-dicétogluconique dans 150 ml d'eau à 0°C et à un pH de 9,5. Lorsque l'addition est terminée, on ajuste le pH de la solution à 7 environ par addition d'acide chlorhydrique 6N et on effectue une lyophilisation qui donne 16,3 g de substance solide. On dissout une portion de 15,0 g de la substance solide lyophilisée dans 250 ml d'un mélange de méthanol et d'eau à 95:5 en ajoutant 100 ml de résine Amberlyst 15 (Rohm and Haas, Philadelphie, PA 19105) et on fait refluer pendant environ 16 h. Après refroidissement, on sépare la résine par filtration, on fait passer le filtrat sur 40 ml de résine d'échange ionique Amberlyst A-21 (Rohm and Haas, Philadelphie, PA 19105) et on concentre sous vide. Les cristaux qui apparaissent au repos sont séparés par filtration et lavés à l'acétone; on obtient ainsi 2,21 g (21%) de 2-acétogulonate méthylique (point de fusion 150-154°C; la littérature indique 155-157°C); l'analyse par chromatographie en phase liquide sous haute pression et l'analyse spectroscopique (^{13}C) montrent que l'isomère a une pureté de 97%. Le 2-cétogulonate méthylique peut être transformé en acide ascorbique par chauffage en présence de bicarbonate de sodium sous atmosphère d'azote.