



(12)

BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **145719**

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(22) Data de depozit: **08.08.90**

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(30) Prioritate:

(86) Cerere internațională PCT:
Nr.

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(87) Publicare internațională:
Nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
28.02.95 BOPI nr. 2/95

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 4173562; EP 127411

(45) Data publicării brevetului:
BOPI nr.

(71) Solicitant: The Nutrasweet Company, Deerfield, Illinois, US

(73) Titular: (71)

(72) Inventatori: Hill John B; Gelman Yefim, Dryden Hugh L.Jr, Erickson Robert A, Hsu Kuang, Johnson Mark R, US

(54) **Procedeu pentru prepararea clorhidratului de ester metilic al α -L-aspartil-L-fenilalaninei**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la un procedeu pentru prepararea clorhidratului de ester metilic al α -L-fenilalaninei, intermediar pentru obținerea esterului corespunzător, folosit ca agent de îndulcire, prin reacția dintre acidul L-aspartic, acidul formic, anhidridă acetică și L-fenilalanină, într-un vas, într-o singură zonă de reacție, cuprinzând etapele de : formilarea acidului L-

aspartic pentru obținerea anhidridei N-formil-L-aspartice, cuplarea acesteia cu L-fenilalanină, deformilarea izomerilor *alfa*, *beta* obținuți, esterificarea izomerilor cu metanol, în prezență de acid clorhidric și izolarea clorhidratului obținut.

Revendicări: 20

RO 109447 B1



Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru prepararea clorhidratului de ester metilic al α -L-aspartil-L-fenilalaninei, care se folosește pentru obținerea esterului metilic al α -L-fenilalaninei (α -APM), un agent de îndulcire care este de circa 200 ori mai dulce decât zaharoza. Puterea de îndulcire a acestui compus, o dipeptidă, face posibilă îndulcirea alimentelor și a băuturilor prin folosirea unei cantități mult mai mici decât zahărul. Acestui compus îi lipsește gustul ulterior neplăcut asociat cu alți agenți de îndulcire ca zaharina și ciclamatul.

α -APM este un compus cunoscut (Brevet US 3492131) și sunt cunoscute diferite procedee de preparare a acestuia. Procedeele cunoscute cuprind, însă, faze de izolare și de recuperare dificile.

Esterul metilic al α -L-aspartil-L-fenilalaninei este o dipeptidă compusă esențial din 2 aminoacizi, acid L-aspartic și L-fenilalanină. S-a considerat căva timp că proprietatea de îndulcire a dipeptidei depinde de stereochemia acestor aminoacizi individuali. Fiecare dintre acești aminoacizi poate să existe, fie sub formă de D sau formă de L și s-a determinat că esterii de L-aspartil-L-fenilalanină sunt dulci, în timp ce izomerii corespunzători D-D, D-L și L-D nu sunt dulci. Combinațiile izomerilor care conțin dipeptida L-L. DL-aspartil-L-fenilalanina, L-aspartil-DL-fenilalanina și DL-aspartil-DL-fenilalanina sunt dulci, dar au numai jumătate din puterea de îndul-

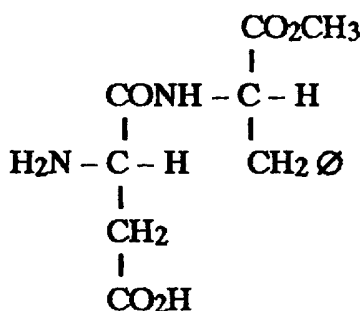
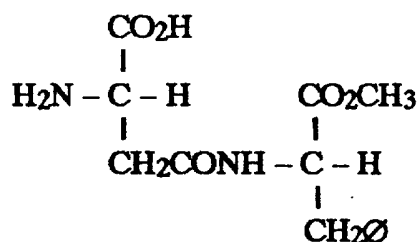
cire, întrucât racematul conține 1/2 din jumătatea L-L.

Dipeptida se produce printr-o reacție de cuplare, în care acidul aspartic este legat cu L-fenilalanină sau esterul său metilic. Reacția de cuplare necesită o grupă amino protectoare atașată la jumătatea de acid aspartic ca: formil, acetyl, acetoacetyl, benzil, carbobenzoxy substituit sau nesubstituit, *tert*-butoxicarbonil și halogenhidratul. Grupa amino protectoare sau N-protectoare este N-formil, considerată ca agent de blocare. Anhidrida aspartică formulată și procedeul său de preparare sunt cunoscute (Brevet US 4173562).

Reacția de cuplare se execută într-un solvent și este o fază cunoscută în diferite procedee pentru producerea de ester α -L-aspartil-L-fenilalaninmetilic (*alfa*-APM) (Brevete US 3962207, 4173562, EP 127411).

În timpul reacției de cuplare a celor doi aminoacizi, se produc doi izomeri ca intermediari și stereochemia lor determină până la urmă puterea de îndulcire a moleculei speciale. Izomerul *alfa* este produsul dorit, în sensul că fracțiuni izolate de *alfa*-APM pură prezintă o putere de îndulcire de circa 200 ori mai mare decât cea a zahărului. Frațiunea de izomer *beta* însă nu prezintă această putere de îndulcire.

Izomerii *alfa* și *beta* prezintă formulele de mai jos:

Izomer α Izomer β 

S-a determinat că formarea izomerilor *alfa* și *beta* și raporturile lor respective din reacția de cuplare, depind de felul solventului folosit pentru executarea reacției, de temperatura la care are loc reacția și de cantitatea de solventi folosiți. Dacă se folosește acid acetic ca solvent în reacția de cuplare, la 50°C, raportul de izomer *alfa/beta* este de 75:25 (Brevet US 4173562). Raportul molar de acid acetic la fenilalanină trebuie să fie de cel puțin 10:1. Raportul de izomeri *alfa/beta* scade considerabil la 69/31 dacă raportul molar acid acetic față de L-fenilalanină este redus la 6:1.

O problemă care apare în folosirea solventilor, constă în faptul că după 0,5...3 h de reacție, amestecul de reacție se solidifică și devine realmente imposibil să se agite sau să se îndepărteze din reactor. Este necesară astfel, o agitare care asigură o amestecare a reactanților pentru realizarea unei reacții complete. În al doilea rând, solventul trebuie să fie îndepărtat mai târziu prin distilare.

O altă problemă constă în faptul, că în anumite cazuri 25% sau mai mult din *alfa*-APM se pierde deoarece rămân în soluția de reacție originală. În plus, anhidrida formil - L - aspartică într-un amestec de reacție din acid aspartic, dă un mare exces de acid formic și anhidridă acetică. Cantitatea în exces de acid formic trebuie îndepărtată într-un anumit moment prin distilare și separare de acid acetic.

Este cunoscut un procedeu similar în care clorhidratul de anhidridă L-aspartică este cuplat cu ester L-fenilalanin-metilic (Brevet US 4173562). O problemă care se ridică în acest procedeu constă în faptul că este necesară o mare cantitate de ester metilic al L-fenilalaninei. În al doilea rând, ca rezultat, se formează cantități importante de tripeptide care trebuie îndepărtate și necesită alte metode de separare.

Procedeul de preparare a clorhidratului de *alfa*-APM prin reacția dintre acidul L-aspartic, acidul formic, anhidridă

acetică și L-fenilalanină, conform invenției, înlătură dezavantajele procedee-
lor cunoscute, prin aceea că, într-o singură
zonă de reacție cuprinde:

5 a). formilarea acidului L-aspartic într-un amestec de reacție de 1,2 până la 1,35 echivalenți molari de acid formic per mol de acid aspartic, 2,2 până la 2,9 moli anhidridă acetică per mol de acid aspartic și cel puțin 0,3 echivalenți molari față de cantitatea totală de acid formic adăugată dintr-un alcool secundar pentru a se obține anhidridă N-formil-L-aspartică, iar anhidrida L-acetică poate fi adăugată fie toată deodată într-o cantitate de 2,3 până la 2,9 moli per mol de acid L-aspartic, fie în două trepte, prima de cel puțin 2,0 mol per mol de acid L-aspartic și cea următoare de circa 0,2 mol per mol de acid L-aspartic;

10 b). cuplarea anhidridei N-formilaspartic *in situ* cu L-fenilalanină în prezența a cel puțin 7 echivalenți molari de acid acetic, față de L-fenilalanină și eventual în prezența unui alchilester și/sau a unui alcool împiedicat, la o temperatură de 5 până la 60°C, pentru a se obține izomeri de α, β -N-formil-L-aspartil-L-fenilalanină cu sau fără agitare;

15 c). deformilare izomerilor prin adăugarea a circa 1,2 mol acid clorhidric per mol de acid L-aspartic;

20 d). îndepărtarea acidului acetic rezidual și a acidului formic din amestecul de reacție;

25 e). esterificarea izomerilor deformilați prin adăugarea a 1 până la 10% în greutate metanol, 32 până la 50% în greutate apă și 9 până la 18% în greutate acid clorhidric la amestecul de reacție pentru a obține clorhidrat de α și β -APM în care precipită clorhidratul de *alfa*-APM și

30 f). izolarea clorhidratului de *alfa*-APM.

35 Procedeu, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

40 - mărirea raportului de *alfa/beta* de APM (HCl) la circa 80/20, dacă acidul acetic folosit ca solvent în reacția de

cuplare, este parțial înlocuit cu un ester alchilic, alcool împiedicat, sau amestec al lor;

- randament mărit al izomerului *alfa* care este produsul final dorit;

- subprodusele de reacție rezultate în timpul formării de anhidridă L-aspartică formilată servesc, de asemenea, ca solvent pentru reacția de cuplare, într-un mod care evită multe din problemele de separare.

La prepararea anhidridei N-formil-L-aspartice se folosește o cantitate minimă de acid formic (1,2...1,35 echivalenți molari per mol acid aspartic) și se convertește excesul la formiat de izopropil prin adăgare de anhidridă acetică și alcool izopropilic.

Anhidrida aspartică formilată se poate apoi cupla *in situ*, prin adăgare de L-fenilalanină (L-Phe). În reacția de cuplare se adaugă eventual, un ester alchilic sau alcool împiedicat și acesta îmbunătățește în mod surprinzător raportul *alfa/beta*. În timp ce un ester se prepară în mod normal prin reacționarea unui alcool cu o anhidridă, este neașteptat că alcoolul împiedicat nu atacă anhidrida formil-aspartică în timpul desfășurării reacției.

Această reacție de cuplare se poate executa cu o agitare slabă, sau chiar deloc, menținându-se o vâscozitate a amestecului de reacție redusă, având ca rezultat un amestec de reacție final fluid.

Apoi, dipeptida rezultată se deformează cu acid clorhidric și se esterifică prin potrivirea concentrațiilor de metanol, apă și acid clorhidric, la cantități eficiente, producându-se *alfa*-APM (HCl) cu randament mare. *Alfa*-APM (HCl) precipită din amestecul de reacție și se izolează și se neutralizează cu o bază, formându-se *alfa*-APM.

Procedeele într-o singură fază de reacție, începe prin amestecarea de acid L-aspartic cu o cantitate minimă de acid formic (cel puțin, 1,2 echivalenți molari față de acid aspartic) și anhidridă acetică (cel puțin circa 2,0 echivalenți molari față

de acidul acetic), în prezența unui catalizator, ca oxid de magneziu rezultând anhidridă N-formil-L-aspartică. Catalizatorii corespunzători sunt cunoscuți și cuprind oxizi, hidroxizi și săruri de metale (Brevete US 4508912; 4550180). Această reacție se execută la temperaturi până la circa 52°C. Amestecul se agită, de preferință, la circa 50°C, cel puțin circa 2,5 h. După circa 2,5 h se adaugă suplimentar anhidridă acetică (circa 0,2 mol) pentru a converti excesul de acid formic neintrat în reacție la anhidrida mixtă formil-acetică. După alte 2,5 h se adaugă un exces de alcool izopropilic (cel puțin circa 0,3 echivalenți molari pe bază de total acid formic adăugat) pentru transformarea anhidridei formil-acetice în formiat de izopropil. Cantitatea de acid formic folosită este, de preferință, de la 1,3 la 1,35 echivalenți molari față de acid aspartic.

În mod alternativ, anhidrida acetică se poate adăuga la amestecul de reacție toată odată (2,3...2,9 mol per mol de acid aspartic) la începutul reacției și alcoolul secundar se poate adăuga după aceea pentru consumarea excesului de acid formic prin reacționare cu anhidrida mixtă, având ca rezultat formarea esterului corespunzător. De asemenea, se poate adăuga o parte minoră de anhidridă acetică cu alcool secundar într-o singură fază. De preferință, însă, acidul formic, o cantitate mai mare de anhidridă acetică și un catalizator se amestecă timp de circa 2...3 h, după care urmează adăgarea unei porțiuni mai mici din anhidrida acetică. Amestecul de reacție se menține în amestecare timp de alte 2...3 h, după care se adaugă alcoolul secundar (izopropanol). Acest amestec de reacție final se amestecă apoi, de preferință, la circa 50°C timp de încă 2...3 h pentru definitivare.

Produsul, anhidridă N-formil-L-aspartică, se lasă apoi să reacționeze cu L-fenilalanină *in situ*, fără să se aplice metode de separare costisitoare și consumatoare de timp. Subprodusele de

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

reacție servesc ca cosolvenți pentru procedeul de cuplare.

L-fenilalanina se cuplează cu anhidrida N-formil-L-aspartică în cantități echimolare, eventual în prezența unui ester alchilic sau a unui alcool împiedicat sau un amestec al acestora. S-a constatat că esterul alchilic și/sau alcoolul împiedicat mărește raportul *alfa/beta* dacă se adaugă în cantitate echivalentă cu cel puțin circa 1,2 mol per mol L-fenilalanină. Raportul *alfa/beta* crește cu creșterea cantităților de ester sau alcool până la un punct când cantitatea molară de ester, alcool sau amestecuri ale lor este de circa 4,7 ori mai mare decât cea de L-fenilalanină. În acest moment se atinge un nivel de saturare, când raportul izomeric rămâne constant indiferent de cât de mult ester sau alcool se mai adaugă.

De preferință, esterul alchilic folosit în reacția de cuplare se alege dintre: acetat de metil, acetat de etil, acetat de izopropil, acetat de *n*-butil și formiat de izopropil. Un ester alchilic preferat este acetatul de metil (MeOAc). Alcoolii împiedicați care se pot folosi cuprind alcool izopropilic și alcool butilic secundar sau terțiar. Alcoolul izopropilic este un alcool împiedicat preferat.

Reacția de cuplare se execută apoi, prin agitarea amestecului sus-menționat timp de circa 4...6 h, la o temperatură cuprinsă între circa 5 și 60°C, de preferință între 15 și 30°C, adică temperatura camerei. O problemă care apare în timpul reacției de cuplare este reacția care are loc cu formarea de N-formil-L-aspartil-L-fenilalanină, amestecul sau suspensia începe să se solidifice, adică viscozitate mare, până în momentul când agitarea devine extrem de dificilă dacă nu, chiar imposibilă. Viscozitatea mare până la acest nivel face filtrarea foarte dificilă și inhibează transferul de căldură care previne distilarea de acid acetic, de ester și/sau de alcool împiedicat descrisă mai jos. S-a constatat că prin adăugarea de acid acetic la reacția de cuplare, această solidificare este inhibată, adică

apare o scădere a viscozității. Aceasta este important în sensul că amestecarea asigură definitivare reacției. De asemenea, acidul și esterii trebuie să fie îndepărtați din amestec prin distilare înaintea deformilării și pentru aceasta amestecul de reacție trebuie să fie agitabil.

Cantitatea de acid acetic adăugată depinde de cât de multă anhidridă N-formilaspartică s-a sintetizat. Întrucât reacția de cuplare se execută *in situ*, în subprodusele de reacție se va găsi deja ceva acid acetic din reacția inițială dintre acid L-aspartic și anhidridă acetică. Cantitatea totală de acid acetic în sistem va fi de circa 7 ori mai mare decât cea de L-fenilalanină, în mol/mol. De aceea, nu va fi necesar să se adauge acid acetic în cantitate de 7 ori mai mare decât cea de L-fenilalanină care s-a adăugat. O cantitate mai mică, în care cantitatea molară totală de acid acetic prezentă în sistem este de circa 7 ori mai mare decât cea de L-fenilalanină, este suficientă.

În timp ce reacția de cuplare se poate executa la temperatura ambiantă, de preferință, se folosesc temperaturi ridicate care contribuie, de asemenea, la scăderea viscozității amestecului de reacție. În mod avantajos, se folosesc temperaturi între 25 și 40°C, iar temperatura preferată este de circa 30°C.

Conform invenției, este importantă scăderea viscozității amestecului de reacție de cuplare prin controlarea agitării amestecului de reacție de cuplare. S-a constatat că oprirea sau reducerea vitezei agitatorului în timpul reacției de cuplare provoacă în mod dramatic o scădere a viscozității amestecului de reacție de cuplare. Într-un reactor mare (10 ft diametru de reactor prevăzut cu agitator mecanic cu palete lungi de 5 ft) o agitare foarte slabă ca 5...40 tur/min și agitare ocazională ca acționarea scurtă a agitatorului la fiecare 5...15 min, se reduce drastic viscozitatea amestecului de cuplare în comparație cu reacții executate cu o viteză de agitare de circa 60 tur/min sau mai mult. În reactori la scară de

laborator (flacon cu fund rotund de 10,24 cm cu palete de 12,7 cm), 200...300 tur/min provoacă un amestec de reacție foarte gros, în timp ce o agitare de 5...15 tur/min produce un amestec de reacție cu viscozitate redusă, foarte curgător. De asemenea, oprirea agitatorului după circa o oră, după ce s-a adăugat L-Phe la amestecul de reacție și repornirea sa după reacție, adică după circa 6 h, produce un amestec de reacție cu o viscozitate mică. Dar într-o operație, la scară industrială, când agitatorul se oprește perioade de timp mai mari de 1 h, poate fi foarte greu să se repornească agitatorul din cauza depunerii și aglomerării precipitatului. De aceea, se preferă agitare slabă și agitare periodică.

În folosirea termenilor "curgător" sau "viscozitate mică", atunci când se referă la amestecuri de reacție de cuplare, aceasta înseamnă un lichid care va curge dintr-un vas de sticlă sau un reactor. Aceste lichide vor avea în general o viscozitate de sub circa 15000 cP, în mod avantajos între 1000 și 10000 cP, de preferință între 150 și 500 cP.

Mijloacele de agitare nu sunt critice, în cadrul procedurii conform invenției. Se pot folosi orice fel de mijloace de agitare standard, adică injecție de gaz inert, scuturare, rotirea reactorului, agitatoare mecanice etc. Se preferă agitatoare mecanice. De asemenea, nu este critică configurația exactă a agitatorului. Cu agitatoare cu palete sau cu lame, viteza de agitare este în mod avantajos de la circa 5 la circa 40 tur/min și, de preferință, de circa 20 tur/min. O viteză a agitatorului sub circa 40 tur/min este acceptabilă pentru reducerea viscozității amestecului de reacție. Se observă însă că, în aparatură la scară de laborator (flacon de 10,2 cm) o viteză de agitare între 40 și 150 tur/min va produce un amestec de reacție fluid.

Izomerii *alfa* și *beta* de N-formil-*alfa*-L-aspartil-L-fenilalanină, (*alfa/beta* F-AP) obținuți, conform invenției, se pot analiza prin cromatografie lichidă de

înaltă performanță (HPLC) și aceasta va arăta că aceste procedee dau un raport *alfa/beta* neobișnuit de mare, de circa 79,5:20,5.

5 Eventual, acidul acetic și orice fel de esteri (acetat de metil, formiat de izopropil etc) sau alcool împiedicat se îndepărtează din amestecul de reacție înaintea fazei de deformilare descrisă mai jos. De preferință, acidul acetic și esterii se distilă în vid între circa 38,1 și circa 63,5 mm Hg. Distilarea în vid se execută înaintea adăugării de acid clorhidric folosit pentru deformilarea de *alfa/beta*-F-AP. Acidul acetic, esterii și/sau alcoolul se recuperează și se reciclează pentru folosire în reacții de cuplare ulterioare.

10 În continuare, izomerii *alfa* și *beta* de N-formil-L-aspartil-L-fenilalanină se deformilează. Se adaugă acid clorhidric și eventual metanol la amestecul de izomeri pentru deformilarea de *alfa/beta* F-AP, rezultând formarea de *alfa/beta*-AP. De asemenea, excesul de metanol reacționează cu ceea ce a rămas din acidul acetic și acidul formic, prezenți în amestecul de reacție, obținându-se acetat de metil și formiat de metil care au puncte de fierbere mult mai reduse decât acidul acetic sau acidul formic și astfel se pot îndepărta din sistem prin distilare la temperaturi mai joase. Amestecul rezultat de *alfa/beta*-AP și diferiții lor esteri metilici, se esterifică apoi prin potrivirea concentrației de acid clorhidric, metanol și apă, la cantități suficiente să producă un randament mare de *alfa*-APM (HCl). Concentrația în metanol va fi de circa 1 la circa 10% în greutate și, de preferință, de circa 3 la circa 5% în greutate. Concentrația de acid clorhidric va fi de circa 9% la circa 18% în greutate și, de preferință, de circa 12,5% la circa 14,5% în greutate. Concentrația de apă va fi de circa 32 la circa 50% în greutate și, de preferință, de circa 37 la circa 42% în greutate. După ce concentrațiile de apă, acid clorhidric și metanol au fost stabilite în mod corespunzător, ames-

tecul de reacție se agită ușor la temperaturi sub circa 35°C și, de preferință, la temperatura ambiantă (20...30°C). Esterificarea este completă în circa 4 la circa 8 zile și de obicei în circa 6 zile.

Clorhidratul rezultat de ester *alfa*-L-aspartil-L-fenilalaninmetilic-*alfa*-APM (HCl) se separă apoi cu ușurință de izomerul *beta* întrucât *alfa*-APM.HCl.2H₂O are o solubilitate mai mică în soluții apoase decât *beta*-APM (HCl). Izomerul *alfa* precipită din soluție și se separă prin filtrare, centrifugare, decantare sau una din multe alte metode obișnuite.

Apoi, *alfa*-APM (HCl) se neutralizează cu o bază formând APM care se recuperează apoi prin metode de cristalizare cunoscute.

Se dau, în continuare, exemple de realizare a procedurii, conform invenției, care nu sunt limitative.

Exemplul 1. Se dizolvă 0,12 g (0,003 mol) catalizator oxid de magneziu în 16 ml (0,405 mol) acid formic soluție 95%. La soluția de mai sus se adaugă 60,2 ml anhidridă acetică și se încălzește la 35...40°C, timp de 10...15 min. Se adaugă apoi 39,93 g (0,3 mol) acid L-aspartic și acest amestec se agită timp de 2,5 h, la 50±2°C. În acest moment se adaugă 8,6 ml anhidridă acetică în plus și reacția se continuă timp de încă 2,5 h la 50±2°C. Apoi la amestecul de reacție se adaugă 9,2 ml (0,120 mol) alcool izopropilic și încălzirea se continuă încă timp de 2 h. În acest moment se formează anhidridă N-formil-L-aspartică așa cum reiese din cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC).

Apoi amestecul de reacție care conține anhidridă N-formil-aspartică se răcește la temperatura camerei, 20...25°C și la acesta se adaugă 150 ml (1,89 mol) acetat de metil urmat de 44,6 g (0,27 mol) L-fenilalanină. Amestecul se agită timp de 3 h, la temperatura camerei (20...30°C). După 3 h de agitare, amestecul se lasă să stea peste noapte (18...24 h) la

temperatura camerei și se solidifică.

Produsul solidificat se dizolvă într-o soluție de metanol și apă (9:1). Amestecul rezultat de izomeri *alfa* și *beta* de N-formil-L-aspartil-L-fenilalanină se analizează prin HPLC și are raportul izomeric *alfa/beta* de 79,2:20,8.

Exemplul 2. Raportul *alfa/beta* de N-formil-L-aspartil-L-fenilalanină preparat prin reacția de cuplare *in situ*, se compară folosind diferiți cosolvenți de ester/alcool. Se dizolvă 0,121 g (0,003 mol) oxid de magneziu în 16 ml (0,406 mol) acid formic de 93,4% sub azot. Apoi la amestecul agitat se adaugă 62,5 ml (0,655 mol) anhidridă acetică și se formează un precipitat alb. Temperatura amestecului se ridică la 37...38°C în timpul următoarelor 30 min. Se adaugă 39,93 g (0,30 mol) acid acetic și amestecul se încălzește la 48...50°C, timp de 2,5 h. Apoi se adaugă încă 8,6 ml (0,09 mol) anhidridă acetică cu încălzire timp de încă 2,5 h. La amestecul de reacție se adaugă 9,2 ml (0,120 mol) alcool izopropilic, încălzirea la 50±2°C continuându-se încă timp de 2 h. Apoi amestecul de reacție se răcește la temperatura camerei (22...27°C).

Prepararea de anhidridă N-formil-L-aspartică se repetă de mai multe ori pentru a se produce mai multe prime amestecuri de reacție. La fiecare din aceste prime amestecuri de reacție se adaugă 100 ml din unul din esterul alchilic sau alcoolul împiedicat, ca solvenți, menționați în tabelul 1, după care urmează adăugarea de 44,6 g (0,27 mol) L-fenilalanină. Suspensiile rezultate se mențin la temperatura camerei timp de 5 h, pentru definitivarea procesului de cuplare *in situ*. Pe măsură ce reacția înaintează, suspensiile se solidifică din ce în ce mai mult în fiecare reacție și pentru a dizolva întreaga cantitate de solide se adaugă o cantitate de metanol și apă ca soluție 10:1. Se analizează 2,0 g alicote în fiecare amestec de reacție prin HPLC. Raporturile *alfa/beta* de N-formil-L-aspartil-

| Solvent | Raport <i>alfa/beta</i> |
|------------------------------|-------------------------|
| Acetat de metil | 79 : 21 |
| Acetat de etil | 79 : 21 |
| Acetat de izopropil | 80 : 20 |
| Acetat de <i>n</i> - butil | 78 : 22 |
| Formiat de etil | 75,5 : 24,5 |
| Formiat de izopropil | 78 : 22 |
| Alcool izopropilic | 78 : 22 |
| Alcool <i>sec</i> - butilic | 76 : 24 |
| Alcool <i>terț</i> - butilic | 78 : 22 |
| Fără solvent | 71 : 29 |

L-fenilalanină rezultate, formate în fiecare reacție, sunt date în tabelul 1.

Exemplul 3. Se prepară din nou anhidridă N-formil-aspartică în condițiile prezentate în exemplul 1. Anhidrida aspartică se lasă în amestecul de reacție original să se cupleze *in situ* cu L-fenilalanină. La amestecul de reacție *in situ* se adaugă 100 ml acetat de metil, 44,6 g (0,27 mol) L-fenilalanină și 84 ml (1,47 mol) acid acetic. Cantitatea totală de acid acetic prezentă în amestecul de reacție este de 166,4 ml (2,912 mol), întrucât există deja ceva ca subprodus în reacția de formare de anhidridă, atunci când anhidrida acetică reacționează cu acid L-aspartic.

Amestecul de reacție de cuplare se agită la temperatura camerei (20...25°C), timp de circa 6 h. Acest amestec nu se solidifică după ce reacția de cuplare a luat sfârșit. Raportul izomeric *alfa/beta* se analizează prin HPLC și este 79,5:20,5.

Exemplul 4. Se prepară anhidridă N-formilaspartică (F-Asp=0), în aceleași condiții ca în exemplul 1, și se lasă în amestecul de reacție original. Reacția de cuplare se execută apoi *in situ*, adăugându-se 44,6 g (0,27 mol) L-fenilalanină, 106,89 g (1,26 mol) acetat de

metil și suficient acid acetic pentru a se obține o cantitate totală de 2,91 mol (vezi exemplul 3).

5 Reacția de cuplare se execută prin agitarea amestecului timp de circa 6 h, la temperatura camerei (20...25°C). La fel, acest amestec nu se solidifică după ce a luat sfârșit reacția de cuplare. Se obține un raport izomeric *alfa/beta* de 79,5:20,5.

10 În tabelul 2, se dau rezultatele în raporturi *alfa/beta* care s-au obținut la introducerea în amestecul de cuplare de diferite concentrații de acetat de metil și acid acetic (AcOH). Cantitățile de anhidridă N-formilaspartică și L-fenilalanină se mențin constante la 0,27 mol pentru fiecare. De asemenea, se mențin constante temperatura și timpurile de reacție. Concentrațiile respective, de acetat de metil și acid acetic în fiecare reacție sunt date în mol solvent per mol L-fenilalanină. Raporturile *alfa/beta* respective, obținute la fiecare amestec, sunt prezentate în dreapta tabelului pentru a verifica modul constant cu care se poate obține un raport mare, aplicând procedeul conform invenției.

25
30

Raport *alfa/beta* referitor la concentrația de AcOH și AcOMe
la cuplarea de L-Phe și F-Asp=0

Tabelul 2

| Nr. experienței | Concentrație moli/moli L-Phe | | Raport <i>alfa/beta</i> |
|-----------------|------------------------------|-------|-------------------------|
| | AcOMe | AcOH | |
| 1 | 4,65 | 0,00 | 80,0/20,0 |
| 2 | 4,65 | 5,34 | 78,6/21,4 |
| 3 | 7,00 | 5,34 | 79,2/20,8 |
| 4 | 4,60 | 10,79 | 79,5/20,5 |
| 5 | 3,49 | 10,79 | 79,2/20,8 |
| 6 | 2,33 | 10,79 | 77,9/22,1 |
| 7 | 1,17 | 10,79 | 77,1/22,9 |
| 8 | 2,94 | 9,00 | 77,4/22,6 |
| 9 | 3,50 | 9,00 | 78,0/22,0 |
| 10 | 2,28 | 7,00 | 77,15/22,85 |
| 11 | 1,17 | 8,58 | 76,3/23,7 |
| 12 | 2,61 | 7,67 | 77,8/22,2 |
| 13 | 0,00 | 5,34 | 69,0/31,0 |
| 14 | 0,00 | 10,50 | 74,0/26,0 |

Exemplul 5. Deși cantitatea de acid acetic în reacția de cuplare este în general de 7 ori mai mare decât cea de L-fenilalanină, s-a demonstrat că și o cantitate mică va acționa drept catalizator. O cantitate de 31,0 g (0,217 mol) anhidridă N-formilaspartică preparată în condițiile exemplului 2, se amestecă cu 150 ml acetat de metil și 25,8 ml (0,45 mol) acid acetic sub azot. Apoi se adaugă 33,0 g (0,20 mol) L-fenilalanină și amestecul se agită la circa 25°C. După 3,5 h, pentru prevenirea solidificării se adaugă încă 100 ml acetat de metil și aceasta se repetă după 4,5 h. După un total de 6 h, suspensia de reacție se dizolvă într-o cantitate suficientă de metanol și apă 10:1. Soluția se analizează prin HPLC și raportul izomeric *alfa/beta* este 80:20.

Exemplul 6. Se dizolvă 0,4 g (0,01 mol) oxid de magneziu în 53,3 ml (1,35 mol) acid formic de 95% și 200 ml (2,10 mol) anhidridă acetică. Reacția produce o creștere a temperaturii la 40°C (de la 20...22°C), în timp de 15 min. La amestecul de reacție se adaugă 133,1 g (1,0 mol) acid L-aspartic și suspensia rezultată se

încălzește la 48...50°C, timp de 2,5 h, în care moment se adaugă 28,9 ml (0,303 mol) anhidridă acetică suplimentar. Încălzirea se continuă timp de alte 2,5 h, după care se amestecă cu 30,7 ml (0,4 mol) alcool izopropilic. Acest amestec se agită timp de 1,5 h la 48...50°C și apoi se lasă să se răcească la temperatura camerei (25±2°C). Amestecul rezultat conține anhidridă N-formilaspartică.

La acest amestec de reacție se adaugă 187 ml acetat de metil și 148,68 g (0,9 mol) L-fenilalanină, dând o suspensie care se agită timp de 1,5 h. Se adaugă 120 ml acid acetic pentru facilitarea agitării și amestecul se menține la 25...26°C, timp de încă 4,5 h. Amestecul se distilă apoi în vid (558,8 mm Hg) până ce amestecul de reacție ajunge la temperatura de 65°C.

Se adaugă 220 ml metanol și 100 ml (1,2 mol) acid clorhidric și se amestecă în suspensia ce se încălzește la circa 60°C, timp de 1 h. Se obține o soluție limpede care se distilă până ce se atinge o temperatură de vârf de 63°C și o temperatură a amestecului de reacție de 73°C. Se adaugă 400 ml metanol supli-

mentar și distilarea se continuă până ce temperatura amestecului de reacție ajunge la 85°C. Reziduul rezidual se răcește la temperatura camerei de circa 25°C, prin supunerea amestecului de reacție la un vid de circa 600.4 mm Hg, timp de 45 min. La reziduul răcit se adaugă apoi 120 ml acid clorhidric soluție de 17%, 19 ml metanol și 94.8 ml apă. Amestecul se agită apoi la temperatura camerei timp de 5 zile.

Suspensia rezultată se filtrează și se spală, obținându-se 197.54 g solid alb după uscare la 50°C, timp de 10 h. Acest produs se analizează prin HPLC și conține 61.5% *alfa*-APM.

Exemplul 7. Se lucrează în aceleași condiții, ca în exemplul 6, cu excepția faptului că se adaugă 400 ml metanol cu o viteză suficientă ca să se obțină un volum constant. Rezultă 197.85 g solid care se analizează prin HPLC, indicând un conținut de *alfa*-APM de 67.18%.

Exemplul 8. Se aplică aceleași condiții, ca în exemplul 6, cu excepția faptului că distilarea finală se execută complet în vid, la o temperatură maximă în vas, de 55...56°C. Randamentul de ester metilic al aspartil-L-fenilalaninei sub formă de clorhidrat este de 51% față de cel teoretic.

Exemplul 9. Se aplică aceleași condiții, ca în exemplul 7, cu excepția faptului că distilarea după adăugare de metanol se execută în vid (508 mm Hg) timp de 2 h, la 55...67°C. Se izolează și se analizează un randament de 186,15 g clorhidrat de ester metilic al *alfa*-L-aspartil-L-fenilalaninei dihidrat, din care 64,68% este ester metilic al *alfa*-L-aspartil-L-fenilalaninei.

Exemplul 10. Se adaugă în picături, 16 ml (0,405 mol) acid formic soluție de 95,7% la 60,2 ml (0,631 mol) anhidridă acetică în timp de 5 min, în care temperatura se ridică la 40°C. Amestecul se agită timp de 55 min și se adaugă 0,43 g (0,003 mol) acetat de magneziu și 39,93 g (0,3 mol) acid L-aspartic. Suspensia rezultată se încălzește la

47...48°C, timp de 2,5 h. Se adaugă 7,1 ml (0,0744 mol) anhidridă acetică și încălzirea se continuă timp de 2,5 h. Se adaugă 7,21 g (0,120 mol) alcool izopropilic și încălzirea se continuă timp de 1,5 h. Încălzirea este discontinuă și se adaugă 130 ml acid acetic și 44,6 g (0,270 mol) L-fenilalanină. Acest amestec se agită la temperatura ambiantă peste noapte. Suspensia rezultată se dizolvă în 750 ml apă și 1,05 l metanol și se cantărește. Se ia o parte alieată și se analizează pentru *alfa*-beta-N-tormil-L-aspartil-L-fenilalanină prin HPLC. Randamentul de izomer *alfa* este de 1,5.

Exemplul 11. Se adaugă 160 ml (0,405 mol) acid formic la 0,121 g (0,003 mol) oxid de magneziu, sub azot și se agită până ce se dizolvă tot solidul. Se adaugă 60,2 ml (0,631 mol) anhidridă acetică obținându-se, imediat, un precipitat și temperatura crește la 40°C în timp de 15 min. Se adaugă 39,93 g (0,3 mol) acid L-aspartic și suspensia se încălzește la 48...50°C, timp de 2,5 h. Se adaugă încă 9,3 ml (0,0974 mol) anhidridă acetică și încălzirea se continuă timp de 2,5 h. Se adaugă 11,9 ml (0,155 mol) alcool izopropilic și amestecul se încălzește timp de 1,5 h. Temperatura crește la 53°C și se adaugă 44,6 g (0,27 mol) L-fenilalanină în 4 porțiuni, în timp de 15 min. Temperatura crește la 58°C, în timp de 10 min și agitarea se continuă încă timp de 50 min. Acest amestec de reacție se lasă apoi să se răcească la temperatura ambiantă. Se adaugă 30,1 ml acid clorhidric soluție 37% și 70 ml apă. Suspensia se încălzește la 60°C și se menține timp de 1 h, în care timp se dizolvă tot solidul. Solventul se îndepărtează prin distilare în vid la temperatura de vas de 55±2°C. Reziduul cântărește 119 g. La reziduu se adaugă 100 g apă și distilarea se repetă, obținându-se un reziduu de 107 g. Se adaugă 50,5 ml acid clorhidric, 41,2 ml apă și 31,5 ml metanol și suspensia se agită la 20...30°C, timp de 4 zile. Solidul se filtrează și se spală cu 50 ml soluție saturată de sare.

Dihidratul clorhidrat de ester metilic al *alfa*-L-aspartil-L-fenilalaninei cristalin, alb, cântărește 43,95 g după uscare peste noapte.

Exemplul 12. O suspensie de anhidridă N-formilaspartică, se prepară ca în exemplul 1. Înaintea adăugării de 44,6 g L-fenilalanină se adaugă 75 ml acetat de metil și 84 ml acid acetic și suspensia rezultată se agită timp de 6 h, la 20...30°C. Se îndepărtează 350 g solvent prin distilare in vacuo de 50 mm Hg. Se adaugă 50 ml soluție acid clorhidric 37% și 66,7 ml metanol și se încălzește la 60...62°C, timp de 1 h. Se adaugă încă 528 ml metanol și se distilă la temperatura în vas de 85°C. Se aplică un vid de 640 mm Hg și solventul se distilă la temperatura în vas de 30°C. Se adaugă apoi 76,4 ml acid clorhidric, 24,4 ml apă și 5,5 ml metanol și amestecul rezultat se agită timp de 4 zile. Precipitatul rezultat se filtrează, se spală și se usucă, obținându-se 63,1 g solid alb. Prin analiză HPLC se

obține un conținut de *alfa*-APM de 63%.

Exemplul 13. Diferite suspensii de anhidridă N-formil-L-aspartică (F-Asp=0) se prepară ca în exemplul 1 și se introduce într-un balon cu fund rotund de 500 ml, prevăzut cu un agitator mecanic. La aceste amestecuri de reacție se adaugă acetat de metil (AcOMe), acid acetic (AcOH) și L-fenilalanină (Phe) în cantități în care raportul molar de AcOAc/AcOH/Phe, F-Asp=0 este de 2,73/10,64/1,0/1,0. Aceste amestecuri de reacție reacționează la temperatura camerei timp de 1 h, cu o viteză de agitare de 200...300 tur/min. La o ora, temperatura se ridică la 40°C și rotația agitatorului se reduce între 5 și 15 tur/min. Conversia, îndeosebi, completă de Phe are loc în 3 h. Se folosește un viscosimetru LV Brookfield pentru măsurarea viskozităților la temperatura camerei, după un timp de reacție de 6 h, incluzând 1,5...2,0 h timp de finalizare, la 50...55°C. Rezultatele sunt date mai jos:

| Viteza agitatorului după prima oră | Temperatura după prima oră | Viscozitate, cP | | | |
|------------------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | 6 ^x | 12 ^x | 30 ^x | 60 ^x |
| 200 - 300 tur/min (control) | camerei | 2860 | 1587 | 819 | 483 |
| 5 - 15 tur/min | 25°C | 1225 | 937 | 490 | 301 |
| 5 - 15 tur/min | 40°C | 690 | 485 | 287 | 170 |

x) Viteza fusului în rotații pe minut

Exemplul 14. Se folosesc aceleași condiții de reacție, ca în exemplul 13, cu excepția faptului că amestecul de reacție nu se agită după prima oră de reacție. După un total de 6 h, amestecul de reacție se va agita, însă va fi nevoie de ajutor pentru pornirea agitatorului. Odată pornit, amestecul de reacție este foarte fluid și curgător și este mai puțin viscos decât un amestec de reacție agitat cu 200...300 tur/min pentru toate cele 6 h. Analiza amestecului de reacție arată conversia completă de Phe.

Exemplul 15. Se execută în aceleași condiții, ca în exemplul 13, cu excepția

laptului că amestecul de reacție se agită scurt, adică timp de 12 s, cu viteză mică, fiecare 5...15 min după 45 min de reacție. Pentru prima oră amestecul de reacție se agită cu 200...300 tur/min. Amestecul de reacție este un lichid curgător la sfârșitul reacției. Analiza amestecului de reacție arată conversia completă de Phe.

Exemplul 16. Se prepară o suspensie de N-formil-L-aspartică (F-Asp=0) în aceleași condiții, ca în exemplul 1, și se introduce într-un balon cu fund rotund de 500 ml, prevăzut cu un agitator mecanic.

Se adaugă la amestecul de reacție AcOMe, AcOH și Phe în cantități în care raportul molar de AcOMe/AcOH(total)/Phe/L-Asp=0 este de 2,73/7,84/1,0/1,0. Reacția se efectuează la temperatura camerei timp de 1 h. cu o viteză de agitare de 200...300 tur/min. Conversia completă de Phe are loc în circa 5 h. La sfârșitul primei ore, viteza agitatorului se reduce

5

la 5...15 tur/min. Se fac, de asemenea, 2 controale cu viteză de agitator de 200...300 tur/min. timp de 6 h. Viscositățile se măsoară cu viscosimetru la temperatura camerei, după o perioadă de reacție care include finalizarea reacției de 1,5...2 h, la 50...55°C.

Rezultatele sunt prezentate mai jos:

| Viteza agitatorului după prima ora | Viscozitatea, cP | | |
|------------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| | 12 ^x | 30 ^x | 60 ^x |
| 200-300 tur/min (control) | 1100 cP | 3740 cP | 5110 cP |
| 200 - 300 tur/min (control) | 12000 | 8000 | 6000 |
| 5-15 tur/min | 6850 | 3740 | 2410 |

x) rotații/min ale fusului

Exemplul 17. Se folosesc aceleași condiții de reacție, descrise în exemplul 16, cu excepția faptului că temperatura amestecului de reacție este mărită la 40°C, când viteza agitatorului este redusă la 5...15 tur/min. Amestecul de reacție rezultat este foarte curgător și mult mai puțin vâscos când verificările se efectuează la 200...300 tur/min. Analiza indică o conversie totală a Phe.

În operații similare, *alfa*-APM (HCl) se produce cu un randament bun, folosind diferiți esteri alchilici, alcoolii împiedicați, parametrii de agitare și metode de distilare descrise mai sus.

Revendicări

1. Procedeu pentru prepararea clorhidratului de ester metilic al α -L-aspartil-L-fenilalaninei, prin reacția dintre acidul L-aspartic, acidul formic, anhidridă acetică și L-fenilalanină, caracterizat prin aceea că într-un vas, într-o singură zonă de reacție cuprinde:

(a). formilarea acidului L-aspartic într-un amestec de reacție de 1,2 până la 1,35 echivalenți molari de acid formic per mol de acid aspartic, 2,2 până la 2,9 moli de anhidridă acetică per mol de acid

10

aspartic și cel puțin 0,3 echivalenți molari față de cantitatea totală de acid formic adăugată, dintr-un alcool secundar pentru a obține anhidridă N-formil-L-aspartică, în care anhidrida acetică poate să fie adăugată, fie toată deodată într-o cantitate de 2,3 până la 2,9 moli per mol de acid L-aspartic, fie în două trepte, prima de cel puțin 2,0 moli per mol de acid L-aspartic și cea următoare de 0,2 mol per mol de acid L-aspartic;

15

20

(b). cuplarea anhidridei N-formil-aspartice *in situ* cu L-fenilalanină în prezența a cel puțin 7 echivalenți molari de acid acetic, pe bază de L-fenilalanină și eventual în prezența unui ester alchilic și/sau a unui alcool împiedicat, la o temperatură de 5 până la 60°C pentru a obține izomeri de α , β -N-formil-L-aspartil-L-fenilalanină, cu sau fără agitare;

25

30

(c). deformilarea izomerilor menționați, prin adăugarea a circa 1,2 moli per mol de acid L-aspartic, de acid clorhidric;

35

(d). îndepărtarea acidului acetic rezidual și a acidului formic din amestecul de reacție;

(e). esterificarea izomerilor deformilați prin adăugarea a 1 până la 10% în greutate metanol, 32 până la 50% în greutate apă și 9 până la 18% în greutate

acid clorhidric la amestecul de reactie pentru a obtine clorhidrat de ester metilic al α , β -L-aspartil-L-fenilalaninei în care clorhidratul de ester metilic al α -L-aspartil-L-fenilalaninei precipită, și

(f). Izolarea clorhidratului de ester metilic al α -L-aspartil-L-fenilalaninei.

2. Procedeu, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că alcoolul secundar din treapta (a) este alcool izopropilic.

3. Procedeu, conform revendicării 2, caracterizat prin aceea că treapta de cuplare (b) este realizată în prezența unui ester alchilic, a unui alcool împiedicat sau un amestec al acestora, într-o cantitate de 1,2 până la 4,7 moli per mol de L-fenilalanină.

4. Procedeu, conform revendicării 1, 2 sau 3, caracterizat prin aceea că treapta de deformilare (c) mai cuprinde adăugarea unei cantități de metanol eficiente pentru esterificarea oricărei cantități de acid formic și acid acetic prezenți în amestecul de reacție și treapta (d) cuprinde îndepărtarea acetatului de metil și formiatului de metil rezultați.

5. Procedeu, conform revendicării 4, caracterizat prin aceea că treapta de cuplare (b) mai cuprinde distilarea în vid a acidului acetic, a alcoolului împiedicat și a esterilor prezenți în amestecul de reacție, înainte de treapta de deformilare (c).

6. Procedeu, conform revendicării 5, caracterizat prin aceea că treapta de îndepărtare (d) este realizată prin distilare atmosferică.

7. Procedeu, conform revendicării 5, caracterizat prin aceea că treapta de îndepărtare (d) este realizată prin distilare în vid.

8. Procedeu, conform revendicării 5, caracterizat prin aceea că esterul alchilic este acetatul de metil, acetatul de etil, acetatul de izopropil, acetatul de *n*-butil, formiatul de izopropil sau amestecuri ale acestora.

9. Procedeu, conform revendicării 5, caracterizat prin aceea că alcoolul împie-

dicat este alcool izopropilic, alcool butilic secundar, alcool butilic terțiar sau amestecuri ale acestora.

10. Procedeu, conform revendicării 5, caracterizat prin aceea că treapta de cuplare (b) este realizată în absența agitării.

11. Procedeu, conform revendicării 4 sau 5, caracterizat prin aceea că treapta de cuplare (b) este realizată sub agitare.

12. Procedeu, conform revendicării 11, caracterizat prin aceea că agitarea este realizată cu un agitator mecanic.

13. Procedeu, conform revendicării 12, caracterizat prin aceea că agitatorul mecanic este acționat cu mai puțin de circa 40 tur/min.

14. Procedeu, conform revendicării 12, caracterizat prin aceea că agitatorul mecanic este acționat periodic în tot timpul reacției.

15. Procedeu, conform revendicării 11, caracterizat prin aceea că agitarea este realizată cu: (a) agitare puternică cu circa 1/2 h după adăugarea L-fenilalaninei și (b) agitare lentă sau intermitentă după adăugarea L-fenilalaninei.

16. Procedeu, conform revendicării 15, caracterizat prin aceea că agitarea este realizată cu un agitator mecanic și: (a) agitarea puternică este realizată la o viteză de rotație de circa 60 tur/min, (b) agitarea lentă este realizată la o viteză de rotație a agitatorului de circa 20 tur/min și (c) agitarea intermitentă este realizată prin acționarea agitatorului cel puțin o dată la fiecare 15 min, timp de cel puțin 1 min.

17. Procedeu, conform revendicării 3, caracterizat prin aceea că treapta de cuplare (b) este realizată la o temperatură de circa 5 până la 40°C, pentru a obține izomerii α , β -N-formil-L-aspartil-L-fenilalanină; treapta de deformilare (c) este realizată în prezența de metanol și treapta (d) este realizată prin distilarea în vid a excesului de acid acetic, acid formic, acetat de metil și formiat de metil din amestecul de reacție.

18. Procedeu, conform revendicării

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

17. caracterizat prin aceea că metanolul este adăugat la reacție în timpul treptei de distilare în vid (*d*), în cantități eficiente pentru a înlesni îndepărtarea acidului acetic și acidului formic prin formarea esterilor de metil corespunzători.

19. Procedeu, conform revendicării

18. caracterizat prin aceea că treapta de cuplare (*b*) este realizată sub agitare, cu

un agitator mecanic la viteze de rotație mai mici decât circa 30 tur/min.

20. Procedeu, conform revendicării 5. caracterizat prin aceea că clorhidratul de ester metilic al α -L.-aspartil-L.-fenilalaninei este neutralizat cu o bază pentru a se forma esterul metilic al L.-aspartil-L.-fenilalaninei.

Președintele comisiei de invenții: chim. Novac Maria
Examinator: ing. Marin Elena

Grupa 12

Preț lei 7800