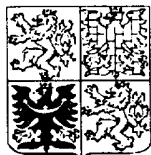


(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **3874-90**

(22) Přihlášeno: **06. 08. 90**

(40) Zveřejněno: **19. 02. 92**
(Věstník č. 2/92)

(47) Uděleno: **02. 12. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **18. 02. 98**
(Věstník č. 2/98)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:
C 07 K 5/06

(73) Majitel patentu:

THE NUTRASWEET COMPANY, Deerfield,
IL, US;

(72) Původce vynálezu:

Hill John B., Woodstock, IL, US;
Gelman Yefim, Arlington Heights, IL, US;

(74) Zástupce:

Hořejš Milan JUDr. ing.;

(54) Název vynálezu:

**Způsob přípravy hydrochloridu
methylesteru
α-L-asparagyl-L-fenylalaninu**

(57) Anotace:

Způsob přípravy hydrochloridu methylesteru α-L-
-asparagyl-L-fenylalaninu, při kterém

a) se formuluje kyselina L-asparagová v reakční
směsi, obsahující kyselinu mravenčí a acetanhydrid,
b) vzniklý anhydrid N-formyl-α-L-asparagové kyseli-
ny se izoluje,

c) anhydrid N-formyl-α-L-asparagové kyseliny se ko-
puluje s L-fenylalaninem v přítomnosti rozpouštědla
při vhodné teplotě,

d) vzniklé α,β-N-formyl-L-asparagyl-L-fenylalaninové
isomery se deformylují přidáním chlorovodíkové ky-
seliny,

e) z reakční směsi se odstraní zbytková kyselina
octová a mravenčí,

f) deformylované isomery se esterifikují přidáním
účinného množství methanolu, vody a chlorovodíko-
vé kyseliny do reakční směsi za vzniku α- a -β-L-
-asparagyl-L-fenylalaninmethylesterhydrochloridu,
přičemž se α-L-asparagyl-L-fenylalanin-
-methylesterhydrochlorid vysráží, a

g) hydrochlorid methylesteru α-L-asparagyl-L-fenyl-
alaninu se izoluje,

přičemž se jako rozpouštědla v kopulačním stupni (c)
používá směs kyseliny octové v dostatečném
množství ke snížení viskozity reakční směsi, aby byla
tato reakční směs míchatelná, a dalšího rozpouštědla

ze souboru, zahrnujícího alkylester, bráněný
alkohol a jejich směsí.

Způsob přípravy hydrochloridu methylesteru α -L-asparagyl-L-fenylalaninu

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu přípravy methylesterhydrochloridu α -(L-asparagyl-L-fenylalaninu) (α -APM(HCl)), kterého se používá k přípravě α -L-asparagyl-L-fenylalaninmethylesteru (α -APM), což je sladidlo, přibližně 200-krát sladší než sacharóza.

10

Dosavadní stav techniky

Charakteristiky dipeptidu α -L-asparagyl-L-fenylalaninmethylester (α -APM) umožňují sladit potraviny a nápoje za použití mnohem menšího množství sladidla než v případě cukru. Tento dipeptid tedy umožňuje milionům spotřebitelů snížit jejich příjem kalorií, aniž by se museli zříkat sladkých pokrmů. Toto sladidlo také nemá nepříjemné doznívání chuti, které je spojeno se sacharinem a cyklamáty. Vynález se také týká zvýšení poměru APM/HCl a způsobu výroby reakční směsi N-formyl- α -L-asparagyl-L-fenylalaninu (FAP), mající míchatelnou viskozitu.

20

α -APM není nový a je popsán v americkém patentovém spise číslo 3 492131 (Schlatter, 1970). Byly pak uděleny četné jiné patenty na různé způsoby jeho výroby a výroby příbuzných sloučenin a existuje četná literatura o dipeptidech a jejich využití v průmyslu nízkokalorických sladidel. Až dosud však způsoby přípravy zahrnovaly nákladné procesy izolace a získání produktu, což je samozřejmě na účet spotřebitelů.

25

α -L-asparagyl-L-fenylalaninmethylester je dipetid, složený v podstatě ze dvou aminokyselin, z kyseliny L-asparagové a z L-fenylalaninu. Již určitou dobu je známo, že sladící charakteristiky dipeptidu jsou závislé na stereochemii jednotlivých aminokyselin. Každá z uvedených aminokyselin může být buď v D formě nebo v L formě a zjistilo se, že L-asparagyl-L-fenylalaninestery jsou sladké, zatím co odpovídající D-D, D-L a L-D isomery nejsou sladké. Směsi isomerů, které obsahují L-L dipeptid, DL-asparagyl-L-fenylalanin, L-asparagyl-DL-fenylalanin a DL-asparagyl-DL-fenylalanin, jsou sladké, avšak jen polovičně sladké, jelikož racemát obsahuje 1/2 L-L podílu.

30

Dipeptid se připravuje kopulační reakcí, při které kyselina L-asparagová se spojuje s L-fenylalaninem nebo s jeho methylesterem. Při této kopulační reakci je třeba chránit aminoskupinu, vázanou na podíl kyseliny asparagové, takovými chránicími skupinami jsou skupina formylová, acetylová, acetoacetylová, benzylová, substituovaná nebo nesubstituovaná karbobenzoxyskupina, t-butoxykarbonylová skupina a hydrohalogenidová sůl. Skupina chránící aminoskupinu se často v oboru označuje jako N-chránící skupina a pro účely tohoto vynálezu se bude označovat jako N-formylová skupina, jelikož se formylového podílu používá podle vynálezu jako blokovacího činidla. Anhydrid N-formylasparagové kyseliny je široce používanou výchozí látkou a způsob jeho výroby je dostatečně popsán. Viz například americký patentový spis číslo 4 173562.

40

45

Izolovaný anhydrid N-formylasparagové kyseliny se získá v poměrně malých výtěžcích, jestliže se jakožto rozpouštědla použije velkého nadbytku kyseliny mravenčí. Například dvojnásobný nadbytek kyseliny mravenčí vytváří potřebu přísady toluenu nebo jiných rozpouštědel ke snížení rozpustnosti anhydridu, čímž se vytváří nutnost nákladného stupně regenerace rozpouštědla.

50

Kopulační reakce se provádí v rozpouštědle a je běžným stupněm četných patentově chráněných postupů výroby methylesteru α -L-asparagyl-L-fenylalaninu (α -APM); viz americký patentový spis číslo 3 962207 (Uchiyama), číslo 4 173562 (Bachman) a evropský patentový spis číslo

127411 (Yaichi a kol). V průběhu kopulační reakce dvou aminokyselin se vytvářejí dva isomery jakožto meziprodukty a jejich atereochemie konečně určuje sladkost příslušné molekuly. Isomer α je žádaným produktem, jelikož izolované frakce čistého α -APM mají sladkost přibližně 130 až 200 krát větší než cukr. Isomer β nemá však žádnou sladkost.

5

Vynález se týká zlepšeného způsobu přípravy α -APM(HCl), který vede ke snížení výrobních nákladů a zvyšuje výtěžky isomeru α , který je žádaným produktem.

10 Podstata vynálezu

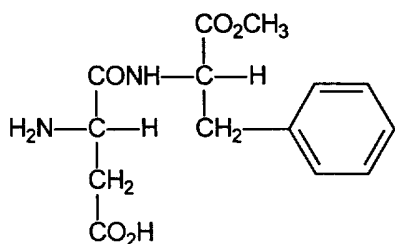
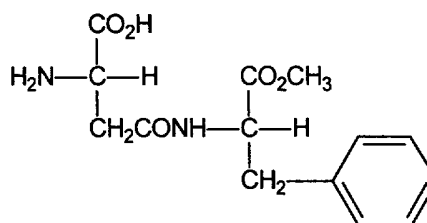
Způsob přípravy hydrochloridu methylesteru α -L-asparagyl-L-fenylalaninu, při kterém

- 15 a) se formuluje kyselina L-asparagová v reakční směsi, obsahující kyselinu mravenčí a acetanhydrid,
- b) vzniklý anhydrid N-formyl- α -L-asparagové kyseliny se izoluje,
- 20 c) anhydrid N-formyl- α -L-asparagové kyseliny se kopuluje s L-fenylalaninem v přítomnosti rozpouštědla při vhodné teplotě,
- d) vzniklé α,β -N-formyl-L-asparagyl-L-fenylalaninové isomery se deformylují přidáním účinného množství chlorovodíkové kyseliny,
- 25 e) z reakční směsi se odstraní zbytková kyselina octová a mravenčí,
- f) deformylované isomery se esterifikují přidáním účinného množství methanolu, vody a chlorovodíkové kyseliny do reakční směsi za vzniku α - a β -L-asparagyl-L-fenylalaninmethylesterhydrochloridu, přičemž se α -L-asparagyl-L-fenylalaninmethylester-
- 30 hydrochlorid vysráží, a
- g) hydrochlorid methylesteru α -L-asparagyl-L-fenylalaninu se izoluje,

35 spočívá podle vynálezu v tom, že se jako rozpouštědla v kopulačním stupni (c) používá směsi (i) kyseliny octové v dostatečném množství ke snížení viskozity reakční směsi, aby byla tato reakční směs míchatelná, a (ii) dalšího rozpouštědla ze souboru, zahrnujícího alkylester, bráněný alkohol a jejich směsi.

40 Způsob podle vynálezu je provozně jednoduchý jednonádobový postup se současně zlepšenými výtěžky žádaného produktu.

Isomery α a β APM mají následující vzorce:

Isomer α Isomer β 

5 Zjistilo se, že vytváření isomerů α a β a jejich poměry závisejí na kopulační reakci, na rozpouštědle, používaném při reakci, na teplotě, za které reakce probíhá, a na množství použitého rozpouštědla. Podle amerického patentového spisu číslo 4 173562 (Bachman) poměr α a β 75:25 je dosažitelný, jestliže se použije jako rozpouštědla kyseliny octové při kopulační reakci, prováděné při teplotě 50 °C. Molární poměr kyseliny octové k fenylalaninu musí být alespoň 10:1. Poměr isomerů α a β klesá závažně k 69:31, jestliže se molární poměr kyseliny octové k L-fenylalaninu sníží na 6:1. Způsob podle vynálezu dokládá, že poměr α a β se může zvýšit přibližně na 80:20, jestliže se kyselina octová, používaná jako rozpouštědlo při kopulační reakci, nahradí částečně alkylesterem, bráněným alkoholem nebo jejich směsí. Bráněným alkoholem se zde míní sekundární nebo terciární alkohol.

15 Problémem, který zůstává při použití těchto rozpouštědel, je skutečnost, že po 0,5 až 3 hodinové reakční době reakční směs tuhne a stává se obtížně míchatelnou, koncentrovatelnou a deformylovatelnou, nebo prostě odstranitelnou z reaktoru. Míchatelnost systému je nutná alespoň ze dvou důvodů. Především míchání zajišťuje promísitelnost reakčních složek k dosažení dokonalého zreagování. Kromě toho se rozpouštědlo musí odstranit později destilací.

Jiným problémem, známým ze stavu techniky, je, že při některých způsobech se 25 % nebo i více α -APM ztrácí, jelikož zůstává v původním reakčním roztoku; viz americký patentový spis číslo 4 173562. Dalším problémem podle amerického patentového spisu číslo 4 173562 je, že se 25 anhydrid N-formyl-L-asparagové kyseliny připravuje reakcí směsi asparagové kyseliny, velkého nadbytku kyseliny mravenčí a acetanhydridu. Nadbytek kyseliny mravenčí se musí v určitá chvíli odstranit destilací a musí se oddělit od kyseliny octové, čímž se náklady na konečný produkt zvyšují.

30 Americký patentový spis číslo 3 962207 popisuje podobný způsob, při kterém se anhydridhydrochlorid kyseliny L-asparagová kopuluje s L-fenylalaninmethylesterem. Problémem při tomto procesu je potřeba velkého množství L-fenylalaninmethylesteru, který zvyšuje výrobní náklady. Kromě toho vede k vytváření významných množství tri-peptidů, které se musí odstraňovat, což vyžaduje nákladně a pracná separační způsoby. Tento nedostatek při způsobu podle vynálezu 35 odpadá.

Americká přihláška vynálezu číslo 156268 popisuje jedno nádobový způsob pro přípravu α -APM, při kterém reakční vedlejší produkty, které vznikají při vytváření formylovaného anhydridu kyseliny L-asparagové, také slouží jakožto rozpouštědla pro kopulační reakci s L-fenylalaninem.

Tento vynález se tedy týká způsobu přípravy α -APM(HCl). Je to proces, při kterém se anhydrid N-formyl-L-asparagové kyseliny vytváří a izoluje z reakce vedlejších produktů před kopulací s L-fenylalaninem. Tato izolace se provádí odfiltrováním anhydridu N-formyl-L-asparagové kyseliny k odstranění nadbytku kyseliny mravenčí. Jelikož je množství použité kyseliny 45 mravenčí minimalizováno, nejsou nutná přídavná rozpouštědla ke snížení rozpustnosti anhydridu

N-formyl-L-asparagové kyseliny. Vyrůstající výtěžky α -APM(HCl) jsou umožněny použitím izolovaného anhydridu N-formyl-L-asparagové kyseliny. Zředění kopulační reakční směsi esterem nebo bráněným alkoholem je také zahrnuto při způsobu podle vynálezu jakožto účinné opatření ke zlepšení výtěžku α -APM(HCl).

5

Anhydrid N-formyl-L-asparagové kyseliny se připravuje nejdříve uváděním do styku kyseliny asparagové s acetanhydridem a s kyselinou mravenčí v podobném reakčním procesu, jaký je znám ze stavu techniky; viz americké patentové spisy číslo 3 933781, 3 962207 a 4 173562. Při způsobu podle vynálezu se však používá minimálního množství kyseliny mravenčí (1,33 až 1,35 molárních ekvivalentů na mol asparagové kyseliny) a nadbytek kyseliny mravenčí se může odstranit jedním z četných způsobů, jako je filtrace nebo odstředění.

10

Anhydrid N-formylasparagové kyseliny se pak může suspendovat nebo rozpustit v kyselině octové a kopulovat přidáním L-fenylalaninu (L-Phe). Do kopulační reakce se popřípadě přidává alkylester nebo bráněný alkohol, čímž se překvapivě zlepšuje poměr α a β . Zatímco se ester zpravidla připravuje reakcí alkoholu s anhydridem, nebylo možno očekávat, že bráněný alkohol nebude napadat anhydrid N-formylasparagové kyseliny v průběhu reakce. Kyselina octová se rovněž přidává jakožto reakční rozpouštědlo. Tato kopulační reakce se může provádět za mírného míchání nebo bez míchání kudržením nízké viskozity reakční směsi, což vede k míchatelné konečné reakční směsi.

20

Získaný dipeptid se pak koncentruje destilací a deformyluje se chlorovodíkem a esterifikuje se nastavením koncentrace methanolu, vody a chlorovodíku na efektivní množství pro výrobu α -APM(HCl) ve vysokém výtěžku.

25

α -APM(HCl) se z reakční směsi vysráží, izoluje se a neutralizuje se zásadou za vzniku α -APM.

α -APM(HCl) se tedy podle vynálezu připravuje zlepšeným způsobem. Proces začíná mícháním kyseliny L-asparagové s minimálním množstvím kyseliny mravenčí (alespoň 1,33 molární ekvivalenty, vztaženo na kyselinu asparagovou) a s acetanhydridem (alespoň 2,0 molární ekvivalenty, vztaženo na kyselinu asparagovou) za vzniku anhydridu N-formyl-L-asparagové kyseliny. Jakožto vhodné katalyzátory se uvádějí oxidy, hydroxidy a soli kovů; tyto katalyzátory jsou uvedeny například v amerických patentových spisech číslo 4 508912 a 4 550180. Tato reakce se provádí při teplotě až přibližně 52 °C. Směs se s výhodou míchá při teplotě přibližně 50 °C po dobu alespoň 2,5 hodin a s výhodou po dobu 6 hodin. Kyseliny mravenčí se s výhodou používá v množství 1,33 až 1,35 molárních ekvivalentů, vztaženo na kyselinu asparagovou.

35

Konečná reakční směs se pak ochladí na teplotu 10 až 20 °C a vyloučená pevná látka se izoluje. Tato izolace je možná odstředěním nebo filtrací a promytím kyselinou octovou. Izoluje se pevný anhydrid N-formyl-L-asparagové kyseliny podle možnosti s ponecháním kyseliny octové ve směsi. Izolovaný anhydrid se vnese do alkylesteru nebo do bráněného alkoholu nebo do jejich vhodné směsi a do přidané kyseliny octové. Vzniklá suspenze se pak nechává reagovat s L-fenylalaninem, s výhodou v ekvimolárním množství.

40

Zjistilo se, že alkylester a/nebo bráněný alkohol zvyšují poměr α a β , pokud jsou přidány v množství ekvivalentním alespoň přibližně 1,2 mol na mol L-fenylalaninu. Poměr α a β se zvyšuje se zvyšujícím se množstvím esteru nebo alkoholu až k bodu, kdy molární množství esteru, alkoholu nebo jejich směsi je přibližně 4,7 násobkem L-fenylalaninu. V tomto bodě se dosahuje hranice nasycení, přičemž poměr isomerů již zůstává konstantní bez zřetele na to, o kolik více esteru nebo alkoholu se přidá.

50

S výhodou se alkylester, používaný při kopulační reakci, volí ze souboru, zahrnujícího methylacetát, ethylacetát, isopropylacetát, n-butylacetát a isopropylformát. Výhodným alkylesterem je

methylacetát (MeOAc). Jestliže se použije methylacetátu, má být přidávané množství 1,2 až 4,7 násobkem množství L-fenylalaninu na bázi mol/mol. Jakožto vhodné bráněné alkoholy, kterých se může použít, se uvádějí isopropylalkohol a sekundární nebo terciární butylalkohol. Výhodným bráněným alkoholem je isopropylalkohol. Výhodná provedení způsobu podle vynálezu nejsou však nijak míněna jakožto omezení vynálezu a může se přirozeně používat i jiných alkylesterů nebo bráněných alkoholů.

Kopulační reakce se provádí za míchání shora uvedené směsi po dobu přibližně 4 až 6 hodin při teplotě 0 až 60 °C a s výhodou při teplotě 15 až 40 °C. Problémem při provádění reakcí je skutečnost, že s vytvářením N-formyl-L-asparagyl-L-fenylalaninu směs nebo suspenze začíná tuhnout, to znamená, že se její viskozita zvyšuje až do bodu, kdy se míchání stává mimořádně obtížným, pokud je ještě vůbec možné. Vysoká viskozita tedy způsobuje, že je míchání nesmírně obtížné a brání se přestupu tepla a tedy oddestilování kyseliny octové, esterů a/nebo bráněného alkoholu, jak bude dále uvedeno. Zjistilo se, že kyselina octová, která se přidá těsně před kopulační reakcí nebo v průběhu kopulační reakce, inhibuje toto tuhnutí, to znamená, že se viskozita směsi snižuje. To je důležité, jelikož míchání zaručuje proběhnutí reakce až do konce. Kyselina a estery se musí odstranit ze směsi destilací před deformylací. Reakční směs musí být míchatelná k podpoře dokonalého proběhnutí reakce.

Množství přidávané kyseliny octové závisí na tom, jak mnoho anhydridu N-formyl-L-asparagové kyseliny se syntetizuje. Jestliže se anhydrid N-formyl-L-asparagové kyseliny izoluje filtrací v přítomnosti kyseliny octové, může být již obsaženo nějaké množství kyseliny octové. Celkové množství kyseliny octové v systému má být přibližně 6 až 16 násobkem množství L-fenylalaninu na bázi mol/mol, s výhodou je 11,1 násobkem množství L-fenylalaninu na bázi mol/mol. Proto není vždy nutné přidávat kyselinu octovou v množství, které je 11,1 násobkem množství L-fenylalaninu. Je dostatečné menší množství, přičemž celkové molární množství kyseliny octové, obsažené v systému, je přibližně 11,1 násobkem L-fenylalaninu.

Další jedinečnou předností způsobu podle vynálezu je skutečnost, že se snižuje viskozita kopulační reakční směsi řízením míchání kopulační reakční směsi. Zjistilo se, že zastavení míchání nebo snížení rychlosti míchání v průběhu kopulační reakce způsobuje dramatické snížení viskozity kopulační reakční směsi. Ve velkém reaktoru (průměr 3,048 m), opatřeném mechanickým míchadlem s lopatkami o délce 1,5 m, velmi pomalé míchání, například za počtu otáček 5 až 40/min, a za občasného míchání jako krátkého běhu míchadla každých 5 až 15 minut se viskozita drasticky snižuje ve srovnání s viskozitou kopulační reakční směsi, kdy se reakce provádí za použití míchadla o rychlosti, dané počtem otáček přibližně alespoň 60/min. V laboratorním reaktoru (baňka s kulatým dnem 100 mm s míchadly 75 mm) vede počet otáček 200 až 300/min k velmi husté reakční směsi, přičemž míchání za počtu otáček 5 až 15/min vede k dobře míchatelné reakční směsi s nízkou viskozitou. Také vypnutí míchadla přibližně jednu hodinu po přidání L-fenylalaninu do reakční směsi a jeho opětné zapnutí po ukončení reakce, tedy po přibližně 6 hodinách, vede k reakční směsi s nízkou viskozitou. Avšak v provozním měřítku, když se míchadlo vypne po jedné hodině, může být opravdu obtížné ho zase posléze zapnout, jelikož dochází k usazování sraženiny a k vytváření koláče.

Pokud se zde používá výrazu "míchatelný" nebo "o nízké viskozitě" v souvislosti s kopulační reakční směsí, míní se, že jde o míchatelnou kapalinu, nebo o kapalinu, kterou je možno míchat nebo vlít do banky nebo do reakční nádoby. Takové kapaliny mají obecně viskozitu přibližně 15 000 mPa s, s výhodou 1000 až 10 000 mPa s, a především 150 až 500 mPa s.

Míchací prostředky nemají pro způsob podle vynálezu rozhodující význam. Může se použít jakýchkoliv běžných míchacích prostředků, například zavádění inertního plynu, třepání, otáčení reaktorem, použití míchadel. Výhodná jsou mechanická míchadla. Rovněž nemá rozhodující význam určitá konstrukce míchadla. Za použití lopatkových nebo listových míchadel je výhodným počet otáček přibližně 5 až 40/min a především přibližně 20/min. Jakkoliv se

obvodová rychlost v m/s značně liší při počtu otáček za minutu v závislosti na délce lopatky, zjistilo se, že charakterizace míchání počtem otáček za minutu je pro způsob podle vynálezu nejpřesnější. Je přijatelná jakákoliv rychlost míchání pod počet otáček 40/min se zřetelem na snížení viskozity reakční směsi. Připomíná se však, že v případě laboratorních zařízení (baňka 5 100 mm) produkuje míchadlo s počtem otáček 40 až 150/min míchatelnou reakční směs.

Isomery α a β N-formyl- α -L-asparagyl-L-fenylalaninu ($\alpha\beta$ F-AP), produkované způsobem podle vynálezu, se mohou analyzovat vysoce přesnou kapalinovou chromatografií (HPLC); analýza dokládá, že se při způsobu podle vynálezu získá nezvykle vysoký poměr α a β přibližně 10 79,5:20,5.

Kyselina octová a veškeré estery (methylacetát, isopropylformát a pod.) nebo bráněný alkohol se popřípadě odstraňují z reakční směsi před deformylací, dále popsanou. S výhodou se kyselina octová a estery oddestilovávají ve vakuu 51 až 98 kPa. Vakuová destilace se provádí před 15 přidáním chlorovodíku, používaným k deformylaci $\alpha\beta$ F-AP. Získá se kyselina octová, estery a/nebo alkohol a vracení se do následující kopulační reakce.

Isomery α a β N-formyl-L-asparagyl-L-fenylalaninu se pak deformylují. Přidává se chlorovodíková kyselina a popřípadě methanol do směsi isomerů k deformylaci $\alpha\beta$ F-AP za vzniku $\alpha\beta$ 20 AP. Nadbytek methanolu také reaguje s jakýmkoliv zbytkem kyseliny octové a kyseliny mravenčí v reakční směsi, čímž se získá methylacetát a methylformát, které mají mnohem nižší teploty varu než kyselina octová a kyselina mravenčí a mohou se tak odstraňovat ze systému destilací při nižší teplotě.

Získaná směs $\alpha\beta$ -AP a její různé methylestery se pak esterifikují k nastavení koncentrace chlorovodíku, methanolu a vody na množství, dostatečná pro dosažení α -APM(HCl) ve vysokém 25 výtěžku. Koncentrace methanolu má být hmotnostně přibližně 1 až přibližně 10 % a s výhodou hmotnostně přibližně 3 až přibližně 5 %. Koncentrace chlorovodíku má být přibližně hmotnostně 9 až přibližně 18 % a s výhodou hmotnostně přibližně 12,5 až 14,5 %. Koncentrace vody má být 30 hmotnostně přibližně 32 až přibližně 50 % a s výhodou přibližně 37 až 42 %. Po příslušné úpravě koncentrace vody, chlorovodíku a methanolu se reakční směs mírně míchá při teplotě přibližně pod 35 °C a s výhodou při teplotě místnosti (20 až 30 °C). Esterifikace je dokonalá za přibližně 4 až přibližně 10 dní a zpravidla za přibližně 6 dní.

Vzniklá hydrochloridová sůl methylesteru α -L-asparagyl-L-fenylalaninu (α -APM(HCl)) se 35 pak snadno oddělí od isomeru β , jelikož α -APM.HCl.2H₂O má nižší rozpustnost ve vodných roztocích než β -APM(HCl); viz americký patentový spis číslo 3 798 207 (Ariyoshi). Isomer α se vysráží z roztoku a oddělí se filtrací, odstředěním, dekantací nebo jiným běžným způsobem.

α -APM(HCl) se pak neutralizuje zásadou za vzniku APM, který se pak získá o sobě dobře 40 známou krystalizací.

Následující příklady způsob podle vynálezu toliko blíže objasňují, nijak jej však neomezují, 45 přičemž, jak je ostatně pracovníkům v oboru známo, jsou možné různé obměny a varianty způsobu.

Příklad 1

Rozpustí se oxid hořečnatý (0,121 g, 0,003 mol) v 19,3 g (0,4 mol) 95 % kyseliny mravenčí v prostředí dusíku. Pak se přidá acethydrid (69,3 g, 0,655 mol) do roztoku za míchání v průběhu 10 až 15 minut. Teplota směsi se zvýší na 40°C. Přidá se L-asparagová kyselina (39,93 g, 0,30 mol) do směsi a vzniklá suspenze se míchá při teplotě 50 °C po dobu 6 hodin. Tak se vytvoří anhydrid kyseliny N-formyl-L-asparagové, jak dokládá vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Směs se pak zfiltruje a promyje se 30 g kyseliny octové k izolaci anhydridu N-formyl-L-asparagové kyseliny. Výtěžek anhydridu kyseliny N-formyl-L-asparagové z kyseliny L-asparagové je 80 % Anhydrid N-formyl-L-asparagové kyseliny obsahuje něco kyseliny octové, která zůstává pro použití jakožto rozpouštědla při kopulační reakci.

Přidá se methylacetát (46,35 g, 49,8 ml) a kyselina octová (159,8 g, 152,1 ml) do anhydridu kyseliny N-formyl-L-asparagové (41,1 g včetně 4,36 g kyseliny octové). Přidá se L-fenylalanin (39,65 g, 0,24 mol) do uvedené směsi a směs se míchá při teplotě přibližně 25°C po dobu přibližně 5 hodin. HPLC analýza dokládá vznik N-formyl-L-asparagyl-L-fenylalaninu s obsahem přibližně 78 % α isomeru a přibližně 22 % β isomeru. Směs se destiluje za tlaku 68 kPa při teplotě 60 až 70 °C k odstranění 120 ml rozpouštědel. Pak se přidá methanol (58,5 ml) a 35 % chlorovodíková kyselina (26,7 ml) do N-formyl-L-asparagyl-L-fenylalaninu a směs se míchá po dobu 30 minut při teplotě 60 °C. Směs se destiluje za tlaku okolí při teplotě 70 až 75 °C k odstranění methylformátu a methylacetátu. V destilaci se pokračuje za přidání dalších 108 ml methanolu. V destilaci se pokračuje za tlaku okolí až do chvíle, kdy teplota dosáhne 85 °C, a pak se použije vakua až do snížení teploty na 30 °C. Přidají se chlorovodíková kyselina (32,4 ml), voda (21,7 ml) a methanol (9 ml) a směs se míchá po dobu 6 dnů při teplotě místnosti (22 až 27 °C); v průběhu této doby se vytvoří a vysráží hydrochloridová sůl methyl esteru α -L-asparagyl-L-fenylalaninu. K promytí produktu se použije nasycené solanky (50 ml). Produkt, bílý hydrochlorid methylesteru α -L-asparagyl-L-fenylalaninu, ve formě dihydrátu se získá v množství 58,8 g a obsahuje hmotnostně 72 % α -L-asparagyl-L-fenylalaninu, což znamená 60 % výtěžek se zřetelem na výchozí množství L-fenylalaninu.

Příklad 2

Anhydrid N-formyl-L-asparagové kyseliny se izoluje filtrací a promyje se kyselinou octovou. Jakožto rozpouštědel se použije různých alkylesterů a bráněných alkoholů v různém množství ke stanovení vlivu esterů a alkoholů jiných než methylacetát na poměr α a β isomeru. Různé estery a alkoholy jsou uvedeny v tabulce I vždy s používaným množstvím a je také vždy uveden poměr α a β isomeru, získaný s jednotlivým rozpouštědlem.

Anhydrid kyseliny N-formyl-L-asparagové (28,6 g, 0,20 mol) se suspenduje ve 100 ml kyseliny octové a v 0,90 mol příslušného korozpouštědla v prostředí dusíku. Do každé reakční směsi se přidá L-fenylalanin (33,04 g, 0,20 mol) a vypláchne se 20 ml přídavné kyseliny octové. Každá směs se míchá při teplotě místnosti (22 až 27 °C) po dobu přibližně 5 hodin. Když se blíží ukončení kopulační reakce, suspenze houstne a stává se objemnější. Každá suspenze se pak udržuje na teplotě 50 °C po dobu jedné hodiny a pak se přidá směs 10:1 methanolu a vody až do rozpuštění všech pevných podílů. Každá směs se zváží a 1 gram alikvot se vyjme a analyzuje se HPLC. Získaný poměr α a β za použití každého rozpouštědla je uveden v tabulce I.

Tabulka I

	Rozpouštědlo	Množství	Poměr
5	methylacetát	71,5 ml	79:21
	ethylacetát	88,0 ml	80:20
	isopropylacetát	105,5 ml	81:19
	n-butylacetát	118,5 ml	81:19
	methylformát	55,5 ml	76:24
10	isopropylformát	71,0 ml	78:22
	isopropylalkohol	69,0 ml	77:23
	sek.butylalkohol	82,5 ml	78:22
	terc.butylalkohol	85,0 ml	79:21
	samotná kyselina octová	51,5 ml	76:24
15			

Příklad 3

- 20 Způsobem podle příkladu 1 se připraví anhydrid kyseliny N-formyl-L-asparagové a izoluje se z výchozí reakční směsi odfiltrováním a promyje se kyselinou octovou. Smísí se 13,3 g (0,1 mol) anhydridu N-formyl-L-asparagové kyseliny se 34,41 g (0,405 mol) methylacetátu, načež se přidá 14,57 g (0,09 mol) L-fenylalaninu do směsi. Míchá se po dobu přibližně tří hodin, suspenze se ponechá přes noc při teplotě místnosti (20 až 25°C). Vzniklá směs se rozpustí ve směsi 9:1 methanolu a vody. Poměr α a β isomeru, zjištěný HPLC N-formyl-L-asparagyl-L-fenylalaninu je 80:20.
- 25

Průmyslová využitelnost

- 30 Rozpouštědlová směs umožňující provozně jednoduchý jednonádobový způsob přípravy hydrochloridu methylesteru α -L-asparagyl-L-fenylalaninu ve zlepšených výtěžcích za použití izolovaného anhydridu N-formyl-L-asparagové kyseliny.
- 35

PATENTOVÉ NÁROKY

- 40 1. Způsob přípravy hydrochloridu methylesteru α -L-asparagyl-L-fenylalaninu, při kterém
- a) se formuluje kyselina L-asparagová v reakční směsi, obsahující kyselinu mravenčí a acetanhydrid,
- 45 b) vzniklý anhydrid N-formyl- α -L-asparagové kyseliny se izoluje,
- c) anhydrid N-formyl- α -L-asparagové kyseliny se kopuluje s L-fenylalaninem v přítomnosti rozpouštědla při vhodné teplotě,
- 50 d) vzniklé α,β -N-formyl-L-asparagyl-L-fenylalaninové isomery se deformylují přidáním chlorovodíkové kyseliny,
- e) z reakční směsi se odstraní zbytková kyselina octová a mravenčí,

- f) deformylované isomery se esterifikují přidáním účinného množství methanolu, vody a chlorovodíkové kyseliny do reakční směsi za vzniku α - a β -L-asparagyl-L-fenylalanin-methylesterhydrochloridu, přičemž se α -L-asparagyl-L-fenylalanin-methylesterhydrochlorid vysráží, a
- g) hydrochlorid methylesteru α -L-asparagyl-L-fenylalaninu se izoluje,
- v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se jako rozpouštědla v kopulačním stupni (c) používá směsi (i) kyseliny octové v dostatečném množství ke snížení viskozity reakční směsi, aby byla tato reakční směs míchatelná, a (ii) dalšího rozpouštědla ze souboru, zahrnujícího alkylester, bráněný alkohol a jejich směsi.
2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že kopulační stupeň (c) přidavně zahrnuje vakuové oddestilovávání kyseliny octové, přítomného bráněného alkoholu a esterů před deformylačním stupněm podle odstavce (d), přičemž deformylační stupeň (d) dále zahrnuje přidávání množství methanolu, účinného k esterifikaci jakékoli kyseliny mravenčí a kyseliny octové, obsažené v reakční směsi, a stupeň (e) zahrnuje odstraňování vzniklého methylacetátu a methylformátu.
3. Způsob podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se odstraňování podle odstavce (e) provádí destilací za tlaku okolí.
4. Způsob podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se odstraňování podle odstavce (e) provádí vakuovou destilací.
5. Způsob podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se neutralizuje vzniklý hydrochlorid methylesteru α -L-asparagyl-L-fenylalaninu zásadou na methylester α -L-asparagyl-L-fenylalaninu.
6. Způsob podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že celkové molární množství kyseliny octové je alespoň šestinásobkem množství L-fenylalaninu.
7. Způsob podle nároku 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že celkové molární množství přítomné kyseliny octové je 11-násobkem množství přítomného L-fenylalaninu.
8. Způsob podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se alkylester přidává ve stupni podle odstavce (c) v molárním množství alespoň 1,2-násobném než je množství obsaženého L-fenylalaninu.
9. Způsob podle nároku 8, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že alkylesterem je methylacetát, ethylacetát, isopropylacetát, n-butylacetát, isopropylformát nebo jejich směs.
10. Způsob podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se bráněný alkohol přidává ve stupni (c) v molárním množství, které je alespoň 1,2-násobkem množství přítomného L-fenylalaninu.
11. Způsob podle nároku 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že bráněným alkoholem je isopropylalkohol, sekundární butylalkohol, terciární butylalkohol nebo jejich směs.

12. Způsob podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se směs alkylesteru a bráněného alkoholu přidává ve stupni (c) v molárním množství alespoň 1,2-násobném se zřetelem k množství přítomného L-fenylalaninu.
- 5 13. Způsob podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se kopulační stupeň (c) provádí bez míchání.
14. Způsob podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se kopulační reakce (c) provádí za míchání, dostatečného k vytvoření míchatelné konečné reakční směsi.
- 10 15. Způsob podle nároku 14, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se míchání provádí mechanickým míchadlem.
16. Způsob podle nároku 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že otáčky mechanického míchadla jsou 40/min.
- 15 17. Způsob podle nároku 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se mechanické míchadlo otáčí periodicky v průběhu reakce.
- 20 18. Způsob podle nároku 16, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že podmínky míchání jsou tyto:
- a) první půlhodinu po přidání L-fenylalaninu se míchá intenzivně,
- 25 b) pak se míchá pomalu a přerušovaně.
19. Způsob podle nároku 18, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se míchání provádí mechanickým míchadlem, přičemž
- 30 a) při intenzivním míchání jsou otáčky míchadla 60/min,
- b) při pomalém míchání jsou otáčky míchadla 20/min,
- 35 c) přerušované míchání se provádí zapínáním míchadla každých 15 minut na dobu alespoň jedné minuty.
20. Způsob přípravy hydrochloridu methylesteru α -L-asparagyl-L-fenylalaninu podle nároku 1,
- 40 **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že
- a) se formyluje kyselina L-asparagová v první reakční směsi kyseliny mravenčí a acethydridu za vzniku anhydridu kyseliny N-formyl-L-asparagové,
- 45 b) vzniklý anhydrid kyseliny N-formyl-L-asparagové se izoluje,
- c) kopuluje se anhydrid kyseliny N-formyl- α -L-asparagové s L-fenylalaninem v přítomnosti (i) kyseliny octové a (ii) alkylesteru, bráněného alkoholu nebo jejich směsi za molárního poměru bráněného alkoholu, alkylesteru nebo jejich směsi k L-fenylalaninu alespoň 1,2:1,
- 50 při teplotě 5 až 40°C za vzniku α,β -N-formyl-L-asparagyl-L-fenylalaninových izomerů,
- d) vakuově se oddestilovává kyselina octová a methylacetát z reakční směsi,

- e) uvedené isomery se deformylují přidáním účinného množství chlorovodíkové kyseliny a methanolu,
- f) z reakční směsi se vakuově oddestilovává kyselina octová a mravenčí,
- g) deformylované isomery se esterifikují přidáním účinného množství methanolu a chlorovodíkové kyseliny do reakční směsi, čímž se získá hydrochlorid methylesteru α , β -L-asparagyl-L-fenylalaninu, přičemž se hydrochlorid methylesteru α -L-asparagyl-L-fenylalaninu vysráží, a
- h) izoluje se hydrochlorid methylesteru α -L-asparagyl-L-fenylalaninu.
21. Způsob podle nároku 20, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že 1) molární poměr kyseliny octové k L-fenylalaninu je alespoň 11:1 a 2) methanol se přidává do reakce v průběhu vakuové destilace (f) v množství, účinném k usnadnění odstraňování kyseliny octové a kyseliny mravenčí vytvářením odpovídajících esterů.
22. Způsob podle nároku 20, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že alkylesterem je methylacetát, ethylacetát, isopropylacetát, n-butylacetát, isopropylformát nebo jejich směs.
23. Způsob podle nároku 20, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že bráněným alkoholem je isopropylalkohol, sekundární butylalkohol, terciární butylalkohol nebo jejich směs.
24. Způsob podle nároku 21, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se kopulační reakce (c) provádí za míchání, dostatečného k vytvoření míchatelné reakční směsi.
25. Způsob podle nároku 23, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se míchání provádí mechanickým míchadlem s otáčkami menšími než 30/min.
26. Způsob podle nároku 25, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se stupeň (b) provádí bez přidávání rozpouštědla.
27. Způsob podle nároku 26, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že množství kyseliny mravenčí v reakční směsi podle stupně (a) nepřevyšuje 1,35 molárních ekvivalentů na mol kyseliny L-asparagové.

Konec dokumentu
