

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 155605 B



(21) Patentansøgning nr.: 2464/83

(22) Indleveringsdag: 31 maj 1983

(41) Alm. tilgængelig: 02 dec 1983

(44) Fremlagt: 24 apr 1989

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 01 jun 1982 US 383393

(51) Int.Cl.⁴

C 07 K 5/06

C 07 C 143/02

A 23 L 1/236

(71) Ansøger: *G.D. SEARLE & CO.; P.O. Box 1045; Skokie; Ill. 60076, US

(72) Opfinder: Josep Heng-Ko *Tsau; US, James George *Young; US

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

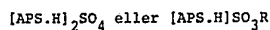
(54) Dipeptidsødemiddelsalt samt opløsning, materiale og drikkevareblanding indeholdende saltet

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

2464-83

Dipeptidsødemiddelsalte med formelen



hvor R er C₁₋₃-alkyl, APS har formelen $\text{H}_2\text{NCHCONHCHCO}_2\text{R}^1$, hvor
 HO_2CCH_2 er R²
R¹ er C₁₋₆-alkyl, og R² er phenyl, phenylalkyl, phenylalkylenyl
eller cyclohexylalkylenyl, hvor alkylenyl- eller alkylgruppen
har 1-5 carbonatomer, udmærker sig god varmostabilitet og dermed
god lagerholdbarhed, de har ingen ubehagelig eftersmag, og de
opløses hurtigt i vandige medier, også når disse er kolde.

DK 155605 B

Den foreliggende opfindelse angår et hidtil ukendt dipeptidsødemiddelsalt, der har lavt kalorieindhold og ikke har nogen ubehagelig eftersmag, og som endvidere har høj termisk stabilitet og hurtigt opløses i vandige medier.

5 Opfindelsen angår desuden en opløsning, et til fremstilling af sukkerverarer og slik egnet materiale og en drikkevareblending indeholdende saltet.

Kendte dipeptidsødemidler er aspartyl-substituerede alaninforbindelser, der har en sødeevne, der er mange gange

10 kraftigere end saccharoses. De blev opdaget i 1960'erne og er blevet udviklet som sukkererstatninger med lavt kalorieindhold. De har ikke kunstige sødemidlers bitre eftersmag, og eftersom de er sammensat af naturlige aminosyrer, assimileres de naturligt.

15 Farmakologisk acceptable syresalte af dipeptidsødemidlerne er blevet beskrevet som værende i besiddelse af samme sødevirkning som de frie base-sødemidler. Desuden opløses de hurtigt i vandige medier, jfr. USA patentskrifterne nr. 4.029.701 og 3.714.139. Kendte dipeptidsalte om-

20 fatter hydrohalogenidsaltet, hydrogensulfatsaltet og dihydrogenphosphatsaltet som beskrevet i USA patentskrifterne nr. 4.031.258 og 4.029.701.

Til trods for det tiltrækkende ved anvendelsen af dipeptidsødemidlerne og deres syresalte som sødemidler fore-

25 kommer der visse vanskeligheder. De frie base- og kendte saltformer af sødemidlerne udviser i reglen ringe termisk stabilitet. Når de derfor anvendes i fødemidler, der kræver varm tilberedning, eller når de blandes med fødevarerbestanddele og gennemgår en opvarmningsproces, såsom pasteurisation, har de en tendens til at blive varmenedbrudt. Desuden

30 påvirker deres lave varmestabilitet lagerholdbarheden på negativ måde. Som følge heraf er de frie base-former og kendte saltformer af sødemidler ikke særlig anvendelige til brug i fødevarer med mange anvendelsesformål, og de kan

35 ikke universelt anvendes i stedet for sukker.

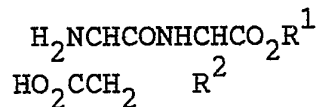
Det er således opfindelsens formål at udvikle et

dipeptidsødemiddelsalt, der kan anvendes til næsten alle former for sødning, har høj varmemestabilitet, lang lagerholdbarhed og en høj grad af opløselighed i vandige medier, specielt et aspartyl-dipeptid-sødemiddelsalt, der har disse

5 egenskaber.

Dette formål opnås med dipeptidsødemiddelsaltet ifølge opfindelsen, der er ejendommeligt ved, at det har den almene formel

10 $[\text{APS.H}]_2\text{SO}_4$ eller $[\text{APS.H}]\text{SO}_3\text{R}$
 hvor R er C_{1-3} -alkyl, og APS har formlen



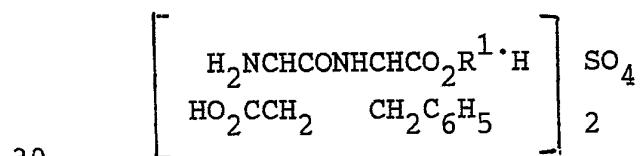
15

hvor R^1 er C_{1-6} -alkyl, og R^2 er phenyl, phenylalkyl, phenylalkenyl eller cyclohexylalkenyl, hvor alkenylgruppen har 2-5 carbonatomer, og alkylgruppen har 1-5 carbonatomer.

20 Disse salte udviser høj varmemestabilitet ved anvendelse i bagte produkter, buddinger, sukkervarer, gelé og varme drikke, opløses hurtigt i mad, der skal sødes, og har lang lagerholdbarhed.

Især foretrækkes ifølge opfindelsen sødemiddelsalte, hvor R^1 er methyl, eller hvor R^1 er methyl, og R^2 er benzyl, specielt et sødemiddelsalt med formlen

25



i hvilken R^1 er methyl.

Sødemiddelsaltet ifølge opfindelsen kan anvendes i fødevarer, nydelsesmidler og farmaceutiske præparater. Ved fødevarer forstås en blanding, opslætning, dej, emulsion eller pasta af tørre, fedtholdige, olieholdige eller fugtige

35 fødevarebestanddele, der kan kombineres med sødemiddelsaltet.

Foretrukne former for fødevarbestanddele består af en bage-
dej, en dressingemulsion og en sukkervareopslæmning. Desuden
omfatter fødevarerne en hovedsagelig tør fødevarerblanding
til fremstilling af ikke-alkoholiske drikke, der kan kom-
5 bineres med sødemiddelsaltet. En sådan form for drikkevare-
blandning kan være en sammenpresset tablet.

Opløsningen ifølge opfindelsen er ejendommelig ved
det i krav 5's kendetegnende del anførte. Materialet ifølge
opfindelsen, der er egnet til fremstilling af sukkervarer
10 og slik, er ejendommeligt ved det i krav 6's kendetegnende
del angivne. Drikkevareblandingen ifølge opfindelsen er
ejendommelig ved det i krav 7's kendetegnende del angivne.

Ved farmaceutiske præparater skal forstås f.eks.
tabletter, væsker, eliksirer og sirupper, der skal sødes.
15 Sødemidlet vil maskere den ubehagelige smag, der er typisk
for sådanne lægemidler som penicillin og tetracyclin.

De her omhandlede dipeptidsødemiddelsalte i form af
sulfater eller organosulfonatsalte kan fremstilles ved at
dispergere den fri base af dipeptidsødemidlet i en lille
20 smule af et varmt polært medium såsom vand, der indeholder
den saltdannende syre, hvorefter der tilsættes et varmt,
mindre polært, dermed blandbart opløsningsmiddel til fældning
af saltet. Desuden kan denne fremgangsmåde anvendes til at
fremstille næsten alle dipeptidsødemiddel-syre- og -basesalte
25 såsom hydrochloridsaltet og natriumbisulfatsaltet. Frem-
gangsmåden vil som udbytte give store mængder af saltene i
meget ren tilstand i forhold til de udbytter og renheder,
der opnås ved hjælp af andre fremgangsmåder.

Dipeptid-sødemiddel-sulfat- og organosulfonatsaltene
30 ifølge opfindelsen udviser betydelig termisk stabilitet og
opløses hurtigt i vandige medier. Desuden forlænger de fak-
torer, der medvirker til forøget varmestabilitet, også sal-
tenes lagerholdbarhed.

Den lave varmestabilitet, der gør sig gældende hos
35 de kendte dipeptid-sødemiddel-salte, såsom hydrochloridet og
bisulfatet, hænger sammen med den lave varmestabilitet, som

de frie baseformer af dipeptidsødemidlerne udviser. Heraf følger, at syredipeptid-sødemiddelsalte almindeligvis ikke vil kunne forventes at have en væsentlig højere varmestabilitet.

5 Det er derfor overraskende, at dipeptidsødemiddel-
-sulfat- og -sulfonatsaltene ifølge opfindelsen, der er
syresalte, udviser varmestabilitet, der tillader en effektiv
anvendelse i minimale sødemiddelniveaumængder og under varme
10 tilberednings-, opvarmnings- eller bagebetingelser. Desuden
er det overraskende at konstatere, at saltene ifølge opfin-
delsen har en meget hurtig opløsningshastighed i kolde van-
dige medier. Følgelig kan saltene ifølge opfindelsen næsten
overalt anvendes i stedet for sukker. De kan anvendes i
15 frie base-former og kendte saltformer af dipeptidsødemidler
ikke har disse egenskaber.

Ved fremstilling af saltene ifølge opfindelsen blandes
et dipeptidsødemiddel med en lille smule stærkt polært opløs-
ningsmiddel, der indeholder den passende syre til saltdan-
20 nelse, så at vægtforholdet mellem sødemiddel og polært opløs-
ningsmiddel er fra ca. 30 til 50%. Mængden af syre, dvs.
svovlsyre eller sulfonsyre (RSO_3H), der typisk anvendes,
vil ligge på ca. 1 ækvivalent, dvs. hhv. mængder på $\frac{1}{2}$ og
1 mol. Under dette trin kan blandingen forblive ved omgivel-
25 sernes temperatur eller kan varmes forsigtigt op til en
temperatur på ca. 40-60°C, fortrinsvis 50°C. Hvis blandingen
opvarmes, vil saltdannelse have en tendens til at forløbe
ud fra en homogen opløsning (medens blandingen ved lavere
temperaturer forbliver uklar og heterogen). Almindeligvis
30 er der dynamisk ligevægt mellem fast stof og opløste former
for sødemidlet, hvilket vil forårsage dannelse af saltet,
selv om blandingen er heterogen. Det er typisk, at der ved
opvarmning vil fås en klar opløsning.

Efter omrøring og eventuelt opvarmning af den vandige
35 blanding i ca. 2-60 minutter, fortrinsvis 5-10 minutter,
sættes der til blandingen et moderat polært organisk opløs-
ningsmiddel, der er blandbart med det stærkt polære opløs-

ningsmiddel, og som er opvarmet til en tilsvarende temperatur. Den mængde moderat polært opløsningsmiddel, der skal anvendes, bør være tilnærmelsesvis 5-15 gange mængden af det tilstedeværende stærkt polære opløsningsmiddel, fortrinsvis ca. 10 gange denne mængde. Omdannelsen af mediet fra et stærkt polært til et moderat polært system bevirker opløsning af alt fri base-sødemiddel og urenheder, såsom dipeptidsyre og diketopiperaziner, der kan være til stede, samt udfældning af saltet. Der kan også anvendes køling for at fælde yderligere salt fra mediet.

Anvendelige stærkt polære opløsningsmidler omfatter vand, dimethylsulfoxid, dialkylformamid med 1 eller 2 carbonatomer i hver alkylgruppe og alkylalkoholer med 1-4 carbonatomer. Det moderat polære opløsningsmiddel, der anvendes, skal vælges således, at dets polaritet er mindre end det særlige stærkt polære opløsningsmiddels, som anvendes. Anvendelige moderat polære opløsningsmidler omfatter alkylalkoholer med 1-4 carbonatomer, dialkylketoner med 3-6 carbonatomer, aliphatiske estere med 3-6 carbonatomer, chlorerede carbonhydrider med 1-3 carbonatomer, carbonhydrider med 5-8 carbonatomer og andre lignende organiske væsker. Foretrukne stærkt polære opløsningsmidler er vand og alkylalkohol. Foretrukne moderat polære opløsningsmidler er alkylalkohol og chlorerede carbonhydrider. Særligt foretrukne stærkt polære og moderat polære opløsningsmidler er hhv. vand og alkohol.

Dersom der er en betydelig mængde uopløst fast stof til stede under processen, vil ændringen i de uopløste faste stoffers fysiske udseende være et tegn på saltdannelse. I vand eller vand/organisk opløsningsmiddelmedium fremtræder saltet som et fibrøst, tykt og skylignende bundfald, der har tendens til at koagulere og danne en geleret blanding. Dette er i modsætning til fri base-dipeptidsødemiddel, der fremtræder som en findelt, partikelformet suspension med lav viskositet.

Det er vigtigt at bemærke, at betingelser, der omfatter varme, vand og syre, almindeligvis vil bevirke hydrolyse

og nedbrydning af dipeptider. Heraf følger, at behandling af et dipeptidsødemiddel på ovenstående måde i reglen bør undgås, eftersom sødemidlet må forventes at blive ødelagt. Ikke desto mindre sker dette ikke. Man mener, at hastigheden af saltdannelse og udfældning under fremgangsmådens betingelser effektivt hindrer hydrolyse.

Andre metoder, der er anvendelige til fremstilling af saltene ifølge opfindelsen, omfatter sprøjtetørring, frysetørring, lyophilisering eller tromletørring. Medens disse fremgangsmåder og ovennævnte fremgangsmåde vil give et dipeptidsødemiddelsalt med høj termisk stabilitet, giver den indledningsvis omtalte fremgangsmåde et salt med moderat højere opløsningshastighed og meget høj renhed. Årsagerne til den forbedrede opløsningshastighed som funktion af fremgangsmåden er ikke fuldt opklarede.

Prøver med hensyn til stabilitet over for varmenedbrydning og ved lagring foretages på prøver af nogle salte ifølge opfindelsen, fri base-dipeptidsødemidlet, hydrochloridsaltet og hydrogensulfatsaltet belyser den forøgede varmestabilitet hos saltene ifølge opfindelsen. Ved varmenedbrydningsprøver viser analytisk undersøgelse af resten, der er til stede efter 7 minutters, 15 minutters eller 25 minutters opvarmning til ca. 170°C, at sulfatsaltet ifølge opfindelsen udviser væsentlig varmestabilitet, medens sammenlignings-eksemplerne udviser betydelig nedbrydning. Fri base-dipeptidsødemidlet og dets bisulfatsalt vil vise helt op til 85% nedbrydning, og hydrochloridsaltet vil have en nedbrydning på mindst ca. 45%, medens sulfat- og methylsulfonatsaltene ifølge opfindelsen udviser mindre end hhv. ca. 10 og ca. 30%'s nedbrydning under disse betingelser. Ved prøverne med hensyn til lagerstabilitet udviser sulfatsaltet ifølge opfindelsen typisk mindre nedbrydning end hydrochloridsaltet efter opvarmning under fremskyndede betingelser såsom ca. 85°C i ca. 15 dage eller 70°C i ca. 15 dage i en atmosfære med 100%'s fugtighed.

Varmestabiliteten hos saltene ifølge opfindelsen påvises endvidere ved forsøg med kagebagning. Ved dette

forsøg fremstilles sødede formkager ved kendte procedurer og under anvendelse af de korrekte ingredienser, men ved brug af dipeptidsødemiddel i stedet for sukker. Anvendelse af eksempler på salte ifølge opfindelsen og kendte dipeptider og salte såsom hydrochloridet giver ca. 20 cm's gule kager, der kan anvendes til en sammenligning af sødemiddelindhold. Kagerne bages typisk ved ca. 175°C i ca. 30-45 minutter. Når der udtages midterudsnit af prøve kagerne, og disse analyseres for indhold af dipeptidsødemiddel, kan der også foretages en bestemmelse af den procentvise nedbrydning af den form for dipeptidsødemiddel, der anvendes. Ved en typisk kageprøve med hensyn til termisk stabilitet vil en kage bagt med sulfatsaltet ifølge den foreliggende opfindelse typisk indeholde ca. 50% mere dipeptidsødemiddel end en kage bagt med hydrochloridsaltet; smlg. f.eks. ca. 34% sødemiddeludvinding for sulfatet med ca. 25% for hydrochloridet.

En prøvesmagning af de med dipeptidsødemiddel bagte formkager kan også foretages under standardbetingelserne for enkeltblindprøve. En prøvesmagning af et panel vil vise, at dipeptidsødemiddel-sulfatsaltet ifølge opfindelsen giver en sødhed i kagen, der næsten svarer til sukkers, medens fri base-dipeptidsødemidlet i reglen giver kager med ringe sødhed og en fad smag.

Undersøgelser med hensyn til opløsningshastighed for sulfat- og sulfonatsaltene ifølge opfindelsen sammenlignet med kendte salte såsom hydrochlorid- og bisulfatsalte illustrerer, at salte ifølge opfindelsen i reglen udviser meget høje opløsningshastigheder, der ligner hydrochloridets. Desuden har sulfatsaltet uventet en opløsningshastighed, der er mindst ca. 5-6 højere end hastigheden for det tilsvarende hydrochloridsalt. Ved et typisk sulfat-hastigheds-eksempel vil sødemængden af sulfatsaltet opløses fuldstændig i køleskabskølet lemonade uden omrøring. Det tilsvarende hydrochlorid kræver betydelig tid og omrøring for at opløses i den i køleskab afkølede lemonade.

Under den termiske nedbrydning af dipeptidsødemidler

omfatter de fremkomne nedbrydningsprodukter de individuelle aminosyrer, der udgør dipeptidet, og diketopiperaziner dannet ved aminosyreacyklisering. Disse produkter har ikke dipeptidsødemidlets søde smag. Eftersom varmenedbrydningen ødelægger sødemidlets vigtigste egenskab, vil der derfor kræves 5 store mængder sødemiddel for effektivt at søde bagværk, sukkervarer og væsker. Dette er helt klart uønsket, fordi der også vil forekomme store mængder nedbrydningsprodukter.

Dipeptidsødemiddelsaltene ifølge opfindelsen løser 10 dette problem og opfylder et behov for et enkelt effektivt dipeptidsødemiddel til almen brug i såvel kolde som varme fødevarer og nydelsesmidler. Saltene opløses hurtigt i kolde vandige medier. De er derfor effektive sødemidler til brug i ikke-alkoholiske drikke og kolde drikkevarer. Desuden har 15 saltene forøget varmemestabilitet. De er derfor effektive sødemidler til brug ved bagning og madtilberedning, og de har lang lagerholdbarhed.

Til typiske anvendelsesformål kan dipeptidsødemiddelsaltene ifølge opfindelsen anvendes alene eller sammen med 20 søde, tørre eller flydende fødevarer eller nydelsesmidler. Sammensætninger med saltet kan omfatte inaktive rumfangsforøgende midler såsom gummiarter, dekstriner, maltose og hydrolyserede stivelser. Disse sammensætninger kan anvendes til at producere sødemidler med samme sødeevne som sukker 25 regnet efter rumfang. Typiske anvendelsesformål for sødemiddelsammensætninger omfatter sødede cornflakes og frugt. I forvejen emballerede kageblandinger og andre tørre fødevarer- og nydelsesmiddelblandinger kan også fremstilles ved anvendelse af dipeptidsødemiddelsalte i mængder, der svarer 30 til sukkers sødeniveau, og idet man regner med den mindre nedbrydning, der forekommer under bagning.

Fremgangsmåderne til fremstilling af sådanne nydelsesmidler og fødevarer er enkle. Fysisk blanding af sødemiddelsaltet med produktet, der skal fremstilles, vil i reglen 35 være tilstrækkeligt til at sørge for ensartet og fuldstændig sødning. De niveauer sødemiddel, der skal anvendes, vil

være de, der tilnærmelsesvis svarer til sukkersødhedsniveauer. Selv om disse niveauer almindeligvis kan bestemmes empirisk ved smagning på sammenligningsprøver, vil det i reglen være tilstrækkeligt at anvende den molære mængde salt, der svarer til ca. 19 mg methylaspartylphenylalanin, svarende til ca. 5 g sukker.

Man mener, at den fuldstændige fordeling af sødemiddelsaltet i blandingen, der skal bages eller tilberedes, lettes ved den høje opløsningshastighed. Saltet diffunderer igennem dejens, buddingens eller blandingens vandfase, fordi det er let opløseligt deri. Sødemidlet fordeles igen gennem blandingen, efterhånden som det føres videre med vandfasen. Man mener derfor, at den hurtige opløsningshastighed og den høje varmestabilitet begge er gavnlige til bageformål.

En yderligere fordel er de hurtigt opløselige saltes højere åbenbare sødhed. Når man smager på dem, vil den letthed, hvormed de opløses, hurtigt optage smagssansen. Dette skaber så igen følelsen af en meget sød smag i sammenligning med smagen af de salte, der opløses langsommere.

Vandige opløsninger og drikkevarer, der indeholder sødemiddelsaltene ifølge opfindelsen, kan også fremstilles på enkel måde. Blanding, rystning og omrøring alene eller kombineret med opvarmnings- og omrøringstrin vil tillade fremstilling af sådanne sødede væsker. Iskolde opløsninger og blandinger af vandige væsker, drikkevarer og sødemiddelsaltene kan også fremstilles ved at blande sødemidlet og andre bestanddele i vandige eller andre opløsninger. En foretrukken sammensætning til et drikkevarepulver er en komprimeret tablet, der indeholder saltet og de andre faste bestanddele. Det vil være en fordel ved længere tids lagring af drikkevarer, hvori sødemiddelsaltene indgår, at anvende hovedsagelig tørre blandinger, der kan rekonstitueres med f.eks. vand og vand med kulsyre, på fremstillingstidspunktet. Saltene vil undergå en vis nedbrydning ved længere tids kontakt med vand.

Et væskesødemiddelkoncentrat, der kan anvendes straks

til at søde fødevarer og drikkevarer eller som oparbejdnings-
hjælpemiddel ved fremstilling af sødede nydelsesmidler eller
fødevarer, kan fremstilles ud fra sødemiddelsaltene ifølge
opfindelsen ved at mætte en vandopløsning med sødemiddel-
5 saltet. I reglen vil sådanne vandopløsninger indeholde ca.
10-60 vægtprocent sødemiddelsalt. De kan fremstilles ved
enkle metoder såsom omrøring eller iblanding. Der kan, om
nødvendigt, benyttes hjælpeopvarmning.

Koncentrerede sødemiddelopløsninger kan anvendes i
10 stedet for sødemiddel i tør form til at søde drikkevarer og
tørre fødevarer såsom cornflakes, kaffe, te, limonade, vand
og andre tilsmagte flydende opløsninger eller suspensioner.
Koncentratet fungerer som oparbejdningshjælpemiddel, der
muliggør hurtig og i det væsentlige fuldstændig fordeling
15 af sødemidlet. Et typisk eksempel er en sødemiddelopløsning
anbragt i en automat, hvorfra sødemidlet kan afmåles nøj-
agtigt. Opløsningen sprøjtes derpå, dryppes eller afmåles
på anden måde til produktet under dettes fremstilling.

Typiske anvendelsesformål til fødevarer og drikkevarer
20 for sødemiddelsaltene ifølge opfindelsen omfatter sådanne
materialer, der kan emballeres som fødevare- eller drikke-
vareblandinger med et lille indhold af vand. Disse omfatter
kage- eller småkageblandinger, buddingpulvere, ikke-alkoho-
liske drikkevareblandinger, sukkervareblandinger, gelatine-
25 pulvere og andre lignende fødevareblandinger, der indeholder
tørre bestanddele eller desuden indeholder organiske fedt-
stoffer og olier. Eksempler, der indeholder fedtstoffer og
olier, omfatter salatdressing, mayonnaise, sennep, færdig-
lavede fødevarer med indhold af olier og fedtstoffer
30 og olieemulsioner i mindre mængde vand.

De følgende eksempler tjener til yderligere belysning
af enkeltheder ved tilberedning og afprøvning af saltene
ifølge opfindelsen.

Eksempel 1Bis(hydrogen-aspartylphenylalanin-methylester)-sulfat

1,66 g (96%'s) svovlsyre opløses i 40 ml destilleret vand og opvarmes til ca. 40°C. Til denne opløsning tilsættes 5 10,0 g aspartylphenylalanin-methylester, og blandingen omrøres. Efter at esteren er opløst, så at der fremkommer en klar opløsning, tilsættes 400 ml ethanol opvarmet til ca. 60°C under omrøring. Opløsningen filtreres hurtigt, og filtratet afkøles til ca. 5°C til fældning af sulfatsaltet. 10 Det udfældede salt filtreres, vaskes med kold ethanol og tørres i vakuum ved ca. 50°C i ca. 2 timer, hvilket giver ca. 11 g af det i overskriften nævnte salt. De fysiske data for dette sulfatsalt er anført i tabel I.

Eksempler på sulfonatsaltene ifølge opfindelsen fremstilles ved den ovenstående fremgangsmåde, og der anvendes 15 en passende organisk sulfonsyre (RSO_3H) i stedet for svovlsyre. De fysiske data for sulfonatsaltene, der fremstilles, findes i tabel I.

Sulfonatsaltene har formlen: [aspartyl-phenylalanin- 20 -H] SO_3R .

Tabel ISulfonatsalteHøjtydende væskechromatografianalyse *)

25

Eks. R	Svovl- indhold (%)	APM- indh. (%)		DKP (%)	AP (%)	Vand (%)
		Teor.	Fundet			
30 1	ingen R-gruppe (svovlsyre)	4,66	4,78	85,7	83,7	ikke påvist
2	methyl	8,20	7,83	75,4	73,2	0,1 0,5 3,5

35

*) Den højtydende væskechromatografianalyse (HPLC) foretages ved anvendelse af standardteknik og et analytisk HPLC-system fremstillet af Water Associates, Milford, Mass., USA. Kolonnen er en "Dupont Zorbax C-8"® (E.I. Dupont, Inc.

Wilmington, Delaware)-kolonne, der måler 15 cm x 4,6 mm. Den mobile fase er en blanding af acetonitril, tetrahydrofuran og 0,05 molær vandigt natriumphosphat i forholdet 4:1:45. UV-påvisning af produktet måles ved 210 nm. Strømningshastigheden er 2 ml pr. minut, og injektionsvoluminet er 10 mikroliter. Typiske opholdstider er for aspartylphenylalanin-methylester (APM) 4,3 minutter, diketopiperazin (DKP) 2,2 minutter, aspartylphenylalanin (AP) 1,5 minut. DKP og AP er nedbrydningsprodukter, der typisk findes som urenheder i APM. Procentindholdet af vand bestemmes ved Karl Fischers titreringsmetode.

Eksempel 3

Varmestabilitetsundersøgelse

15 Prøver af saltene i eksemplerne 1 og 2 med en vægt svarende til ca. 40 mg APM og sammenligningsprøver (40 mg) af fri base-aspartylphenylalanin-methylester (APM) og de tilsvarende hydrochlorid-, dihydrogenphosphat- (H_2PO_4) og bisulfat- (HSO_4)-salte med vægt svarende til ca. 40 mg APM
20 anbringes i hver sit 10 ml bager og sættes i en ovn, der er forvarmet til 170°C. Prøverne bager i forud bestemt tid (7,15 og 25 minutter), hvorefter de tages ud af ovnen og analyseres ved HPLC som omtalt ovenfor. Resultaterne af prøverne med hensyn til salte ifølge opfindelsen og sammen-
25 ligningsforbindelser er anført i tabel II.

Tabel II

Varmestabilitet

Prøve	% nedbrydning (170°C)		Fysisk udseende efter	
	7 min.	15 min.	25 min.	25 min. ved 170°C
5 Eks. 1 (sulfat)	1,3	0	5,5	hvidt krystal- linsk pulver
Eks. 2 (me- thylsulfonat)	0,0	0,5	28,0	næsten hvidt pulver
A	0	22,2	87,6	lysegråt materiale
10 B	2	8,5	44,7	smeltet lysebrun masse
C	62,8	78,2	89,2	smeltet farveløs masse
D	0,1	60,6	86,6	gult pulver

A = aspartylphenylalanin-methylester (APM)

15 B = aspartylphenylalanin-methylester-hydrochlorid

C = aspartylphenylalanin-methylester-bisulfat

D = aspartylphenylalanin-phosphat, monobasisk

Eksempel 420 Varmestabilitetsundersøgelser i bagte kager

Der bages lyse kager efter en standardopskrift, men der anvendes et dipeptidsødemiddel eller dets salt og et hævemiddel af modificeret maltdekstrinstivelse i stedet for sukker. De flydende bestanddele piskes sammen og foldes derefter i en sigtet blanding af de tørre bestanddele. Den fremstillede dej fyldes i en smurt bageform på ca. 20 cm og bages ved 175°C i 40 minutter. Der bages tre kager på denne måde: kage nr. 1 indeholder $(\text{APM-H})_2\text{SO}_4$, kage nr. 2 indeholder APM-HCl, og kage nr. 3 indeholder APM.

30 De flydende bestanddele omfatter mælk (193 g), fedtstof til bagværk (54 g), 1 æg (53 g), vanilje (3,6 g). De tørre bestanddele omfatter mel (167 g), bagepulver (6,9 g), salt (3,4 g), hævemiddel (126,5 g), dipeptidsødemiddelsalt: $(\text{APM-H})_2\text{SO}_4$ (kage nr. 1) (1,2 g),
35 APM-HCl (kage nr. 2) (1,2 g), APM (kage nr. 3) (1,0 g).

Der tages kerneprøver fra hver af de tre kager, og prøverne analyseres ved HPLC-metoder som beskrevet i eksempel 1. HPLC-analyseresultaterne er anført i tabel III.

5

Tabel III

Kageanalyse

	<u>APM %*</u>	<u>DKP %*</u>	<u>AP %*</u>	<u>Smag</u>
Kage 1	33,8	41	1,7	sød
Kage 2	25,5	35,5	1,8	sød
10 Kage 3	11	--	--	let sød

Kage 1 - (APM-H)₂SO₄

Kage 2 - APM-HCl

Kage 3 - APM

- 15 *APM = aspartylphenylalanin-methylester
 *DKP = diketopiperazin, et nedbrydningsprodukt af APM
 * AP = aspartylphenylalanin, et nedbrydningsprodukt af APM.

20 Eksempel 5

Undersøgelser af opløsningshastighed

Prøver af saltene i eksempel 1, 2 og APM-hydrochloridet og de tilsvarende bisulfat- og dihydrogenphosphatsalte anvendes til at bestemme forholdet mellem opløsningshastigheder i drikkevarer. Den mængde salt, der anvendes i hvert tilfælde, beregnes som værende ækvimolær med 57 mg APM. Prøverne foretages i fire typer flydende drikke-medier: 25 (1) køleskabskølet vand tilsat kulsyre (240 ml), (2) køleskabskølet limonade uden sukker (240 ml), (3) køleskabskølet kaffe (80 ml) og (4) kaffe ved omgivelsernes temperatur 30 (80 ml). Opløsningshastigheden i medium (1) måles uden omrøring, og hastighederne i (2), (3) og (4) måles under omrøring. Opløsningen anses for at være fuldstændig, når der ikke mere forekommer faste partikler eller mediet er uklart. 35 Resultaterne findes i tabel IV.

Tabel IV

Opløsningshastigheder

Prøve	Opløsningstidsrum (sekunder) i medie			
	(1)*	(2)*	(3)*	(4)*
5 Eks. 1	22	ca. 0	24	22
Eks. 2	168	250	-	167
B	120	52	94	90
C	-	-	-	330
D	-	-	-	600

- 10 * (1) er køleskabskølet vand med tilsat kulsyre
 (2) er køleskabskølet limonade uden sukker
 (3) er køleskabskølet kaffe
 (4) er kaffe ved omgivelsernes temperatur.

- Eks. 1 er $(\text{APM.H})_2\text{SO}_4$
 15 Eks. 2 er $(\text{APM.H})\text{SO}_3\text{CH}_3$
 B er APM-hydrochlorid
 C er $(\text{APM.H})\text{HSO}_4$
 D er $(\text{APM.H})\text{H}_2\text{PO}_4$

20 Eksempel 6Bestemmelse af lagerholdbarhed

To sæt prøver af APM-sulfatsaltet ifølge eksempel 1, APM-hydrochlorid og APM, hver med en vægt svarende til 40 ml APM, anbringes i ovne, der indeholder et åbent bager med vand. Det første sæt prøver opvarmes ved 70°C og 100%'s fugtighed i 14,7 dage. Det andet sæt prøver opvarmes ved 85°C og atmosfærisk fugtighed i 14,7 dage. Prøverne analyseres med mellemrum ved hjælp af HPLC som beskrevet tidligere for at bestemme den procentvise nedbrydning. Resultaterne 30 er anført i tabel V.

Tabel V

Bestemmelse af lagerholdbarhed

		HPLC-analyseresultater (% sammensætning) (APM %									
		1.70° begynd.*			6,8 dage*			14,7 dage*			begynd.)
		APM	DKP	AP	APM	DKP	AP	APM	DKP	AP	
5	-										
	Eks. 1	84,8	nd	nd	83,9	nd	nd	82,1	nd	0,20	96,7
	A	96,6	1,0	nd	95,3	1,1	nd	92,6	1,2	0,21	95,9
	B	80,2	nd	nd	77,7	0,25	0,33	75,1	0,6	0,36	93,6
		2.85°C									
10	Eks. 1	som ovenfor			83,0	0,15	nd	80,9	0,08	0,20	95,4
	A	som ovenfor			95,2	1,6	nd	91,7	2,0	0,20	94,9
	B	som ovenfor			62,1	4,0	1,1	46,0	3,2	1,6	57,3

A = APM

15 B = APM.HCl

DKP = diketopiperazin

AP = aspartylphenylalanin

nd = ikke påvist

20 *) Tallene angiver procent af forbindelsessammensætning (APM, DKP og AP), der er til stede på analysetidspunkt. Den sidste kolonne viser den procentmængde APM, der er tilbage i prøverne efter 14,7 dage i forhold til det fra begyndelsen tilstedeværende.

P a t e n t k r a v

1. Dipeptidsødemiddelsalt,
k e n d e t e g n e t ved, at det har den almene formel

5 [APS.H]₂SO₄ eller [APS.H]SO₃R
hvor R er C₁₋₃-alkyl,
og APS har formlen

10
$$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{NCHCONHCHCO}_2\text{R}^1 \\ \text{HO}_2\text{CCH}_2 \quad \text{R}^2 \end{array}$$

hvor R¹ er C₁₋₆-alkyl, og
R² er phenyl, phenylalkyl, phenylalkenyl eller cyclo-
hexylalkenyl, hvor alkenylgruppen har 2-5 carbonatomer, og
alkylgruppen har 1-5 carbonatomer.

15 2. Sødemiddelsalt ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at R¹ er methyl.

3. Sødemiddelsalt ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at R¹ er methyl, og R² er benzyl.

20 4. Sødemiddelopløsning,
k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter et sødemiddelsalt
ifølge krav 1 i vandig opløsning.

5. Opløsning ifølge krav 4,
k e n d e t e g n e t ved, at koncentrationen af saltet er
mindst 8 vægtprocent.

25 6. Til fremstilling af sukkervarer og slik egnet
materiale,
k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder en på modifi-
ceret stivelse baseret bestanddel og et sødemiddelsalt ifølge
ethvert af kravene 1-3.

30 7. Drikkevareblanding,
k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter en tør, ikke-
alkoholisk drikkeblanding og et sødemiddelsalt ifølge krav
1-3.

35 8. Materiale eller blanding ifølge krav 6 eller 7,
k e n d e t e g n e t ved, at den indeholder [aspartyl-phe-
nyl-alaninmethylester-H]₂SO₄ som sødemiddelsalt.