FI000097621B

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 97621

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 27 01 1997

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6

C 07H 17/04, C 12P 19/60, A 23L 1/302, A 61K 7/00

SUOMI-FINLAND (FI)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 901646

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 02.04.90

(24) Alkupäivä - Löpdag 02.04.90

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 22.04.91

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 15.10.96

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

21.10.89 JP 1-274019 P

(71) Hakija - Sökande

1. **Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo**, 2-3, 1-chome, Shimoishii, Okayama-shi, Okayama, Japan, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. **Sakai, Shuzo**, 3-41, 1-chome, Ejiri-asahigaoka, Seto-cho, Akaiwa-gun, Okayama, Japan, (JP)
2. **Yoneyama, Masaru**, 617-1, Kuroo, Souja-shi, Okayama, Japan, (JP)
3. **Miyake, Toshio**, 7-10-403, 1-chome, Okuda, Okayama-shi, Okayama, Japan, (JP)

(74) Asiamies - Ombud: **Oy Kolster Ab**

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Kiteinen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo ja menetelmä sen valmistamiseksi
Kristallin 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyra och förfarande för dess framställning

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

---

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

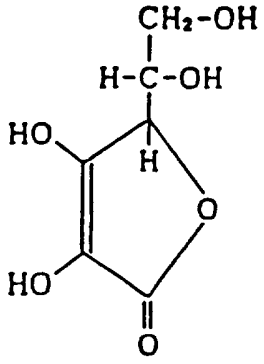
Keksintö koskee kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa ja menetelmää sen valmistamiseksi. Keksinnön mukaisesti kiteinen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo kiteytetään ylikyllästetystä liuoksestaan ja näin saatu tuote otetaan talteen. Kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa käytetään edullisesti C-vitamiinilisänä elintarvikkeissa, farmaseuttisissa tuotteissa ja kosmetiikkatuotteissa.

Uppfinningen avser kristallin 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyra och ett förfarande för dess framställning. Enligt uppfinningen kristalliseras den kristallina 2-O-α-D-flukopyranosul-L-askorbinsyran ur sin övermättade lösning och den erhållna produkten tillvaratages. Kristallin 2-O-α-D-glukopyranosul-L-askorbinsyra används med fördel i vitamin C-anrikande medel, i livsmedel samt i farmaceutiska och kosmetiska medel.

Kiteinen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo ja menetelmä sen valmistamiseksi

Esillä olevan keksinnön kohteena on kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon valmistus ja käyttö.

L-askorbiinihappoa, jonka kemiallinen rakennekaava on (I)



eivät ihmiset, apinat ja marsut syntetisoi in vivo ja tästä syystä se on välttämätön ravinnon aineosa, so. C-vitamiini.

L-askorbiinihappo on osallisena joissakin fysiologisissa toiminnoissa in vivo; esimerkiksi proliinin ja lysiinin hydroksyloinnissa, jotka aminohapot ovat välttämättömiä elävän sidekudoksen pääasiallisen aineosan, kollageenin synteesissä; sytokromi C:n hapetus-pelkistysreaktiossa, jossa Fe^{+++} pelkistyy Fe^{++}:ksi; ja immuuniuden tehostuksessa lisäämällä valkosoluja. Näistä syistä C-vitamiinilla on tärkeä tehtävä elävän kehon terveyden ylläpitämisessä ja edistämisessä.

Keripukki on ollut kauan tunnettu L-askorbiinihapon puutoksesta johtuva tauti ja sille ovat ominaisia ihon heikkous, hiussuonipurkaumat, mustelmat ja ikenien ja luuytimen verenvuoto. Keripukin ehkäisemiseksi ja terveyden ylläpitämiseksi L-askorbiinihapon suositelluksi päiväan-

nokseksi (RDA) on määritelty aikuiselle miehelle 60 mg ja aikuiselle naiselle 50 mg.

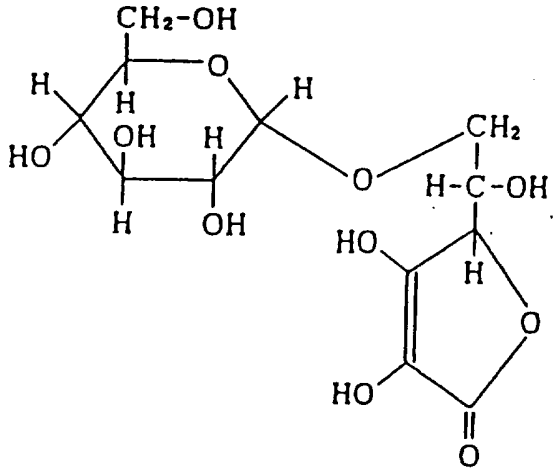
Nykyisin L-askorbiinihappoa ei käytetä ainoastaan valmisteissa, joiden tarkoituksena on C-vitamiinin lisääminen välttämättömänä ravinnon aineosana, vaan sen käyttö on laajentunut erilaisiin tarkoituksiin. Erityisesti kemiallisesta rakenteestaan ja fysiologisista vaikutuksistaan johtuen L-askorbiinihappo on käyttökelpoinen happameksi tekevänä aineena, pelkistimenä, hapetuksenestoaineena, valkaisuaineena ja stabilointiaineena erilaisissa kemiallisissa reagensseissa, elintarvikkeissa ja juomissa; tautien, kuten virustautien, bakteeritautien ja pahanlaatuisten kasvainten ehkäisyyn ja parantamiseen käytetyissä farmaseuttisissa valmisteissa; ja lisäksi pelkistimenä, uv-absorbenttina ja melaniinin muodostumista ehkäisevänä aineena kosmeettisissa ihonhoito- ja ihonvalkaisutuotteissa.

L-askorbiinihapon suurimpana haittana on, että se suoran pelkistysaktiivisuuden, huonon pysyvyyden ja hapettumistaipumuksen johdosta helposti menettää fysiologisen vaikutuksensa.

L-askorbiinihapon stabiloimiseen on ehdotettu käytettäväksi joitakin L-askorbiinihapon sakkaridijohdannaisia. Esimerkiksi julkaisuissa Vitamin, vol. 43, s. 205 - 209 (1971), ibid., vol. 47, s. 259 - 267 (1973) ja JP-patenttijulkaisussa 38 158/73 hakija on esittänyt L-askorbiinihappoglukosidien biokemiallisen synteesin.

Kun otetaan huomioon, että glukosideja valmistetaan samankaltaisin menetelmin ja että muodostamalla eetterisidos L-askorbiinihapon hiilessä numero 6 olevaan primaariseen alkoholiryhmään saadaan glukosideja, joita on kuvattu JP-patenttijulkaisussa esimerkiksi toisen sarakkeen riveillä 14 - 16 ja että sakkaridin siirtoreaktio maltoosista α-glukosyyliryhmäksi saa aikaan glukosidien muodostumisen ja että glukosideilla on suoraa pelkistysaktiivisuut-

ta, niin glukosidien kemiallinen rakenne voidaan esittää seuraavalla kaavalla (II):



Kuten JP-patenttijulkaisun taulukosta 1 ilmenee, glukosidien pysyvyys on selvästi parempi kuin L-askorbiinihapon pysyvyys, mutta ei kuitenkaan kaupalliseksi tuotteeksi riittävän hyvä.

Ishido et al. ovat JP-patenttijulkaisussa 5 920/83 esittäneet orgaanisen kemiallisen menetelmän L-askorbiinihapon sakkaridijohdannaisten valmistamiseksi.

Nämä johdannaiset ovat kuitenkin sellaisia, joissa kaikki D-glukoosit on sidottu ß-asemaan, sillä tämän patenttijulkaisun selityksessä on sarakkeen 7 riviltä 6 sarakkeen 8 riville 11 kuvattu kaikkiaan 21 L-askorbiinihapon ß-D-glukopyranosyylityypin johdannaista, mm. 2,3-di-O-(ß-D-glukopyranosyyli)-L-askorbiinihappo.

Masamoto et al. ovat JP-patenttijulkaisussa 198 498/83 esittäneet orgaanisen kemiallisen menetelmän L-askorbiinihapon sakkaridijohdannaisten valmistamiseksi, jotka kaikki ovat myös ß-glukosyylityyppiä.

L-askorbiinihapon ß-D-glukopyranosyylityypin johdannaisilla tehdyt tutkimukset osoittivat, että näillä oli tuskin lainkaan haluttuja fysiologisia vaikutuksia elävässä kehossa, varsinkaan ihmiskehossa. Lisäksi tavanomaisten orgaanisten kemiallisten menetelmien haittana on, että ne

taloudelliselta teholtaan ovat huonompia, koska reaktio on erittäin monimutkainen ja saannoltaan alhainen, lisäksi saatujen johdannaisten myrkyttömyyden ja turvallisuuden toteaminen on erittäin vaikeaa.

Kuten edellä on kuvattu, L-askorbiinihapon sakkaridijohdannaisia koskevat aikaisemmin esitetyt ehdotukset ovat osoittautuneet vähemmän tyydyttäviksi koskien pysyvyyttä, turvallisuutta, fysiologista aktiivisuutta ja taloudellista tehokkuutta eikä niitä tähän mennessä ole käytännössä hyödynnetty.

Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on voittaa nämä tavanomaisten L-askorbiinihapon sakkaridijohdannaisten haitat. Hakija on erityisesti tutkinut uusia L-askorbiinihapon sakkaridijohdannaisia, joita voidaan valmistaa biokemiallisella menetelmällä käyttäen sakkaridinsiirtoreaktiota.

Kuten JP-hakemusjulkaisussa 127 072/89 on esitetty, hakija on keksinyt uuden yhdisteen, α-glykosyyli-L-askorbiinihapon, erityisesti 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon, jolla ei ole suoraa pelkistysaktiivisuutta, jonka pysyvyys on erittäin hyvä, joka helposti hydrolysoituu in vivo ja jonka fysiologinen aktiivisuus on tyydyttävän korkea; hakija on myös kehittänyt menetelmän tämän yhdisteen valmistamiseksi ja sen käyttämiseksi elintarvikkeissa, juomissa, farmaseuttisissa tuotteissa lääkehoitoon reagoivien tautien hoitoon sekä kosmeettisissa tuotteissa.

Voitiin myös todeta, että koska L-askorbiinihappo nautitaan α-glukosyylisakkaridina 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappona, joka on syntetisoitu ja sitten metaboloituu in vivo, se on turvallisuuden kannalta ihanteellinen ja sopiva uusi L-askorbiinihapon sakkaridijohdannainen.

2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon vesiliuoksesta konsentroimalla ja jauhamalla saatu jauhe on amorfinen ja erittäin hygroskooppinen ja sen epäkohtana

on, että se helposti imee itseensä kosteutta tavallisissa ympäristöolosuhteissa, mistä aiheutuu nesteytymistä ja kovettumista.

Esillä olevassa keksinnössä pyritään sitten voittamaan amorfisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon haitat, varsinkin saamaan aikaan tyydyttävästi vapaasti valuva jauhe, joka ei ole olennaisesti lainkaan hygroskooppinen eikä kovetu normaaleissa ympäristön olosuhteissa.

Hakija tutki kiinteää 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa, joka on olennaisesti ei-hygroskooppinen tavallisissa ympäristön olosuhteissa, minkä johdosta pystytään välttämään amorfisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon epäkohdat.

Tutkimusten tuloksena hakija keksi uuden substanssin, kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon sekä totesi sen olevan olennaisesti ei-hygroskooppinen, tyydyttävästi vapaasti valuva, vedetön kiteinen jauhe, joka ei nesteydy eikä kovetu tavallisissa ympäristöolosuhteissa. Edelleen hakija kehitti menetelmän tällaisen kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon valmistamiseksi sekä myös menetelmät sellaisten elintarvikkeiden ja kosmetiikkatuotteiden valmistamiseksi, jotka sisältävät tätä.

Kuviossa 1 on keksinnön mukaisen kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon uv-absorptiospektri liuoksessa pH-arvossa 2,0.

Kuviossa 2 on kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon uv-absorptiospektri liuoksessa pH-arvossa 7,0.

Kuviossa 3 on kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon infrapunaspektri.

Kuviossa 4 on kontrollina amorfisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon infrapunaspektri.

Kuviossa 5 on mikroskooppikuva (40x) ylikyllästetyssä liuoksessa kasvaneesta kiteestä.

Kuviossa 6 on keksinnön mukaisen kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon ORTEP-kuva.

Esillä olevaa keksintöä voidaan soveltaa mihin tahansa 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoon riippumatta siitä, millä menetelmällä, biokemiallisella tai orgaanisella kemiallisella menetelmällä se on valmistettu.

Kun otetaan huomioon turvallisuus ja taloudellisuus, niin 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo valmistetaan edullisesti biokemiallisella menetelmällä, jossa käytetään joko pelkästään sakkaridinsiirtoentsyymiä tai sitä yhdessä glukoamylaasin kanssa liuoksessa, joka sisältää L-askorbiinihappoa ja α-glukosyylisakkaridia.

Ilmaisulla "ilman suoraa pelkistysaktiivisuutta" tarkoitetaan, että toisin kuin L-askorbiinihapon tapauksessa, sen sakkaridijohdannainen ei pelkistä eikä tee värittömäksi 2,6-dikloorifenoli-indofenolia.

Ilmaisulla "L-askorbiinihappo" tarkoitetaan tässä keksinnössä myös L-askorbaatteja, kuten alkalimetallisuoloja, maa-alkalimetallisuoloja ja näiden seoksia, milloin keksintöä voidaan soveltaa näihin eikä tämä ilmaisu rajoitu siis pelkästään vapaaseen L-askorbiinihappoon. Niinpä tarvittaessa voidaan yhtä hyvin kuin vapaata L-askorbiinihappoa sopivasti käyttää natrium-L-askorbaattia ja kalsium-L-askorbaattia.

Ilmaisut "α-glykosyyli-L-askorbiinihappo" ja "2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo" tarkoittavat paitsi vapaita happomuotoja, myös niiden suoloja, milloin keksintöä voidaan soveltaa käyttäen niitä.

Keksinnössä käytettäviksi sopivia α-glukosyylisakkarideja ovat sellaiset, joita käyttäen sakkaridinsiirtoentsyymin avulla voidaan muodostaa L-askorbiinihaposta α-glykosyyli-L-askorbiinihappo, jossa L-askorbiinihappoon on sitoutunut ekvimolaarinen määrä tai enemmän α-D-glukosyy-

liryhmiä. Esimerkiksi malto-oligosakkaridit, kuten maltoosi, maltotrioosi, maltotetroosi, maltopentoosi, maltoheksoosi, maltoheptoosi ja malto-oktoosi ovat sopivia, samoin osittain hydrolysoitu tärkkelys, kuten dekstriini, syklodekstriini ja amyloosi, nesteytetty tärkkelys, gelatinoitu tärkkelys ja liuennettu tärkkelys.

α-glykosyyli-L-askorbiinihapon muodostumisen helpottamiseksi tulisi valita α-glukosyylisakkaridi, johon käytetty sakkaridinsiirtoentsyymi hyvin vaikuttaa.

Esimerkiksi käytettäessä α-glukosidaaria (EC 3.2.1.20) sakkaridinsiirtoentsyyminä, sopivia ovat malto-oligosakkaridit, kuten maltoosi, maltotrioosi, maltotetroosi, maltopentoosi, maltoheksoosi, maltoheptoosi ja malto-oktoosi sekä myös osittain hydrolysoidut tärkkelykset ja dekstriinit, joiden DE (dekstroosiekvivalentti) on noin 5 - 60. Kun käytetään syklomaltodekstriiniglukanotransferaasia (EC 2.4.1.19) sakkaridinsiirtoentsyyminä, sopivia ovat osittain hydrolysoidut tärkkelykset, kuten gelatinoidut tärkkelykset, joiden De on alle 1 ja dekstriinit, joiden DE on korkeintaan 60. Kun käytetään α-amylaasia (EC 3.2.1.1) sakkaridinsiirtoentsyyminä, sopivia ovat osittain hydrolysoidut tärkkelykset, kuten gelatinoitu tärkkelys, jonka DE on alle 1 ja dekstriinit, joiden DE on korkeintaan 30.

Reaktiossa L-askorbiinihapon konsentraatio on yleensä 1 paino/til.-% tai suurempi, edullisesti noin 2 - 30 paino/til-%, kun sen sijaan α-glukosyylisakkaridin konsentraatio on yleensä noin 0,5 - 30-kertainen L-askorbiinihapon konsentraatioon verrattuna.

Keksinnössä käytettäviksi sopivia sakkaridinsiirtoentsyymejä ovat sellaiset, jotka siirtävät yhden α-glukosyyliryhmän tai useampia α-glukosyyliryhmiä ainakin hiiliatomiin 2 L-askorbiinihapossa ilman tätä hajoamista, kun entsyymin annetaan vaikuttaa liuokseen, joka sisältää L-

askorbiinihappoa ja entsyymin vaikutukselle sopivan herkkää α-glukosyylisakkaridia.

Sopivasti valitaan esimerkiksi α-glukosidaaseja, joita on saatu eläimistä, kasveista ja mikro-organismeista, kuten hiiren munuaisista, rotan suoliston limakalvosta, koiran ohutsuolesta, sian ohutsuolesta, riisinsiemenistä, maissinsiemenistä sekä sukuihin Mucor, Penicillium ja Saccharomyces kuuluvien bakteerien viljelmistä; syklomaltodekstriiniglukanotransferaaseja, joita on saatu sukuihin Bacillus ja Klebsiella kuuluvien bakteerien viljelmistä; ja α-amylaaseja, joita on saatu sukuun Bacillus kuuluvien bakteerien viljelmistä.

Tällaista sakkaridinsiirtoentsyymiä ei välttämättä tarvitse puhdistaa ennen käyttöä, mikäli se täyttää edellä esitetyt vaatimukset. Yleensä esillä oleva keksintö voidaan toteuttaa käyttäen epäpuhtaita entsyymejä. Tarvittaessa sakkaridinsiirtoentsyymi voidaan puhdistaa tavallisella tavalla ennen käyttöä. Keksinnössä voidaan tietenkin käyttää kaupallisesti saatavaa sakkaridinsiirtoentsyymiä. Sakkaridinsiirtoentsyymin määrä ja reaktioaika ovat läheisesti riippuvaisia toisistaan. Taloudelliset näkökohdat huomioiden sakkaridinsiirtoentsyymiä käytetään määrä, jolla saadaan täydellinen reaktio 3 - 80 tunnissa.

Immobilisoituja sakkaridinsiirtoentsyymejä voidaan edullisesti käyttää annoksittain ja jatkuvana suoritetuissa menetelmissä.

Keksinnön mukainen reaktioprosessi suoritetaan tavallisesti lisäämällä sakkaridinsiirtoentsyymiä liuokseen, joka sisältää edellä kuvattuja L-askorbiinihappoa ja α-glukosyylisakkaridia ja pitämällä seosta olosuhteissa, joissa entsyymi on aktiivinen, tavallisesti pH-arvossa noin 3 - 9 ja lämpötilassa noin 20 - 80 °C. Koska reaktion aikana L-askorbiinihappo on taipuvainen hajoamaan hapettumalla, seosta pidetään edullisesti olosuhteissa, joissa se on suojattu mahdollisimman hyvin ilman ja valon vaikutuk-

selta, jotta L-askorbiinihappo pysyisi pelkistävässä muodossa. Reaktio suoritetaan tarvittaessa edullisesti sellaisten aineiden kuin tiourean tai rikkivedyn läsnä ollessa.

Haluttu substanssi voidaan saada lisäämällä L-askorbiinihappoa ja α-glukosyylisakkaridia sellaisen kasvavan mikro-organismin viljelmään, joka pystyy tuottamaan sakkaridinsiirtoentsyymiä.

Yleensä keksinnön mukainen reaktioprosessi suoritetaan antamalla sakkaridinsiirtoentsyymin vaikuttaa sellaisenaan tai yhdessä glukoamylaasin kanssa liuokseen, joka sisältää L-askorbiinihappoa ja α-glukosyylisakkaridia.

Tällainen prosessi on toteutettavissa käyttäen glukoamylaaseja, joita saadaan eri lähteistä, kuten mikro-organismeista ja kasveista. Sopivia ovat tavallisesti kaupalliset glukoamylaasit, joita saadaan sukuihin Aspergillus ja Rhizopus kuuluvista mikro-organismeista.

2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon muodostamiseksi glukoamylaasia voidaan käyttää samanaikaisesti sakkaridinsiirtoentsyymin kanssa. Reaktion tehon parantamiseksi on kuitenkin yleensä edullisempaa käyttää sakkaridinsiirtoentsyymiä ensin siirtämään ekvimolaarinen määrä tai enemmän D-glukoosiryhmiä L-askorbiinihappoon, jolloin muodostuu α-glykoosi-L-askorbiinihappoa ja käyttäen sitten glukoamylaasia 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon muodostamiseen. ß-amylaasia (EC 3.2.1.2) voidaan vapaasti käyttää yhdessä glukoamylaasin kanssa.

Sakkaridinsiirtoentsyymin avulla valmistetuissa α-glykosyyli-L-askorbiinihapoissa on α-D-glukosyyliryhmä, joka sisältää 1 - 7 glukosyyliryhmää α-1,4 liitoksella, jolloin tällainen α-D-glukosyyliryhmä on sitoutunut ainakin hiiliatomissa 2 olevaan primaariseen alkoholiryhmään. Erityisesti mainittakoon esimerkkeinä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo, 2-O-α-D-maltosyyli-L-askorbiinihappo, 2-O-α-D-maltotriosyyli-L-askorbiinihappo, 2-O-α-D-

maltotetrosyyli-L-askorbiinihappo, 2-O-α-D-maltopentosyyli-L-askorbiinihappo, 2-O-α-D-maltoheksosyyli-L-askorbiinihappo ja 2-O-α-D-maltoheptosyyli-L-askorbiinihappo. Vaikka α-glukosidaasi tavallistaa muodostaa vain 2-O-α-D-glykosyyli-L-askorbiinihappoa, niin tarvittaessa 2-O-α-D-maltosyyli-L-askorbiinihappoa ja 2-O-α-D-maltotriosyyli-L-askorbiinihappoa voidaan muodostaa seoksena.

Siinä tapauksessa, että käytetään joko syklomaltodekstriiniglukanotransferaasia tai α-amylaasia, muodostuu seoksena α-glykosyyli-L-askorbiinihappoja, joissa on suurempi α-D-glukosyyliryhmä. Siten syklomaltodekstriiniglukanotransferaasi muodostaa α-glukosyylisakkaridista α-D-glukosyyliryhmän, jonka polymerointiaste on jakautuneena alueella 1 - 7, kun taas α-amylaasilla saadaan jonkin verran kapeampi jakauma. Tällainen seos voidaan tarvittaessa osittain hydrolysoida joko α-amylaasilla (EC 3.2.1.1), ß-amylaasilla (EC 3.2.1.2) tai glukoamylaasilla (EC 3.2.1.3) α-D-glukosyyliryhmän polymerointiasteen pienentämiseksi. Esimerkiksi 2-O-α-D-maltosyyli-L-askorbiinihappo ja korkeammat polymeerit hydrolysoituvat glukoamylaasin vaikutuksesta, jolloin saadaan 2-O-α-D-glykosyyli-L-askorbiinihappoa. ß-amylaasi hydrolysoi pääasiassa 2-O-α-D-maltotetrosyyli-L-askorbiinihapon ja korkeammat polymeerit 2-O-α-D-glykosyyli-L-askorbiinihapon, 2-O-α-D-maltosyyli-L-askorbiinihapon ja 2-O-α-D-maltotriosyyli-L-askorbiinihapon seokseksi.

Näillä menetelmillä saadut reaktioseokset sisältävät tavallisesti yhdessä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon kanssa jäljelle jäänyttä L-askorbiinihappoa, D-glukoosia ja α-glukosyylisakkaridia.

Kun tarvitaan puhdas tuote, jonka 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapposisältö on korkea, tälle reaktioseokselle suoritetaan yksi tai useampi erotustoimenpide, jossa käytetään hyväksi 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon ja epäpuhtauksien, kuten jäljelle jääneen

L-askorbiinihapon, D-glukoosin ja α-glukosyylisakkaridien molekyylipainon ja/tai affiniteetin eroja; tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi membraanierotus, geelisuodatuskromatografia, pylväskromatografia, suurisuorituskykyinen nestekromatografia (HPLC) ja ioninvaihtokromatografia. Tässä tapauksessa erotettua L-askorbiinihappoa ja α-glukosyylisakkaridia voidaan edullisesti käyttää uudelleen lähtöaineina sakkaridinsiirtoreaktiossa. Tarvittaessa reaktioseosta voidaan käsitellä sakkaridinsiirtoreaktion päätyttyä, mutta ennen erottamista esimerkiksi kromatografialla yhdellä tai useammalla menetelmällä; tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi menetelmä, jossa reaktioseosta kuumennetaan ja liukenematon aines poistetaan suodattamalla; ja toinen menetelmä, jossa reaktioseosta käsitellään esimerkiksi aktiivihiilellä proteiiniainesten ja värjäävien ainesten poistamiseksi absorboimalla; ja menetelmä, jossa reaktioseos demineralisoidaan kationinvaihtajahartsilla (H^+-muoto) ja jossa sitä sitten käsitellään anioninvaihtohartsilla (OH^--muoto) anionien ja suolojen poistamiseksi adsorption avulla.

Seuraavassa selvitetään 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon kiteyttämistä. Kiteytettävä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo on tavallisesti ylikyllästettynä liuoksena, jolloin mitä tahansa 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa voidaan valmistustavasta riippumatta käyttää edellyttäen, että siitä voidaan saada kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa. Ylikyllästysaste on tavallisesti noin 1,05 - 1,5. Lähemmin määriteltynä puhtausasteeltaan noin 75-%:inen tai puhtaampi 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo valmistetaan noin 65 - 95-paino/paino-%:iseksi vesiliuokseksi ja lämpötila säädetään tasolle, jossa liuos ei jäädy ja jossa prosessin aikana aiheutuu mahdollisimman vähän lämpöhäviöitä, edullisesti alueelle 0 - 95 °C. Ylikyllästysastetta ja viskositeettia voidaan säätää lisäämällä esimerkiksi meta-

nolia, etanolia tai asetonia. 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon ylikyllästetty liuos pannaan suhteellisen korkeassa lämpötilassa, kuten 20 - 60 °C:ssa kiteyttimeen, siihen lisätään kideytimiä, edullisesti 0,1 - 10 paino/paino-% ja se kiteytetään kidemassaksi samalla hitaasti sekoittaen kiteytymisen nopeuttamiseksi. Täten lisäämällä kideytimiä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon ylikyllästettyyn liuokseen saadaan helposti keksinnön mukaista kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa. Saatu kidemassa muutetaan lopulliseksi kiteiseksi tuotteeksi tavanomaisin menetelmin, esimerkiksi erottamalla, jauhamalla, sumutekuivaamalla tai rakeistamalla leijupedissä.

Erotusmenetelmä, jossa kidemassa tavallisesti erotetaan kiteiseksi 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapoksi ja emäliuokseksi (melassi) korityyppisessä sentrifugissa, on sopiva käytettäväksi ei-hygroskooppisen erittäin puhtaan kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon valmistuksessa ja milloin suurempaa puhtausastetta vaaditaan, erotetut kiteet voidaan pestä suihkuttamalla niille pieni määrä vettä. Erotettu emäliuos puhdistetaan ja konsentroidaan samalla tavalla kuin edellä kidemassa ja käytetään sitten uudestaan, jolloin saadaan talteen toinen ja kolmas kide-erä. Tämä parantaa kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon saantoa.

Koska mainitut kolme muuta menetelmää eivät poista melassia, ne eivät koskaan paranna kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon puhtausastetta lopullisessa tuotteessa, mutta niillä saadaan tuotetta korkealla saannolla. Siten tällainen tuote sisältää tavallisesti esimerkiksi L-askorbiinihappoa, 2-O-α-D-maltosyyli-L-askorbiinihappoa, korkeampia α-glykosyyli-L-askorbiinihappoja, glukoosia ja α-glukosyylisakkarideja yhdessä kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon kanssa.

Sumutekuivauksen tapauksessa kidemassa, jonka konsentraatio on 70 - 85 paino/paino-% ja kiteisyys 25 - 60 paino/paino-%, tavallisesti sumutekuivataan korkeapainesuuttimen lävitse ja saadut pisarat kuivataan ilmavirrassa lämpötilassa esimerkiksi 30 - 60 °C, jossa kiteinen jauhe ei sula ja sitten vanhennetaan 30 - 60 °C:ssa ilmavirrassa noin 1 - 20 tuntia.Näin saadaan helposti ei-hygroskooppinen tai vain lievästi hygroskooppinen kiteinen jauhe. Kun käytetään kappaleen jauhamismenetelmää, niin kidemassa, jonka kosteuspitoisuus on 5,15 paino/paino-% ja kiteisyys noin 10 - 60 paino/paino-%, saa tavallisesti seistä 0,5 - 5 vuorokautta, jolloin se kokonaisuudessaan kiteytyy ja muuttuu kiinteäksi kappaleeksi. Hienontamalla ja kuivaamalla saatu kappale saadaan ei-hygroskooppista tai vain lievästi hygroskooppista kiteistä jauhetta.

Vaihtoehtoisesti 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon liuos konsentroidaan kuumentamalla se sulassa muodossa olevaksi ylikyllästetyksi liuokseksi, jonka kosteussisältö on alle 5 paino/paino-%, jota sulatetta sitten vaivataan yhdessä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon kideytimien kanssa alle sen sulamispsiteen olevassa lämpötilassa ja sulate valmistetaan haluttuun muotoon, esimerkiksi jauheeksi, rakeiksi, tangoksi, levyksi tai kuutioksi. Näin saadaan ei-hygroskooppinen tai tuskin lainkaan hygroskooppinen kiteinen kiinteä tuote. Riippuen puhtausasteesta ja kiteisyydestä kiteinen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo saadaan tällä tavalla olennaisesti ei-hygroskooppisena tai tuskin lainkaan hygroskooppisena, vapaasti valuvana adheesiovapaana tuotteena. Seuraavassa luetellaan joitakin sen hyviä ominaisuuksia:

(1) Sillä ei ole suoraa pelkistysaktiivisuutta ja se on erittäin pysyvä. Toisin kuin L-askorbiinihappo se ei juuri aiheuta Maillard-reaktiota. Näiden ominaisuuksien vuoksi se ei saa aikaan mitään ei-toivottuja reaktioita seoksissa proteiinien, lipidien, sakkaridien ja fysiologi-

sesti aktiivisten aineiden kanssa, vaan se stabiloi nämä aineet.

(2) Se hydrolysoituu helposti L-askorbiinihapoksi ja tämä tekee siitä L-askorbiinihapon veroisen pelkistimen ja hapetuksenestoaineen.

(3) Se hydrolysoituu helposti in vivo entsyymisysteemin vaikutuksesta D-glukoosiksi ja L-askorbiinihapoksi, joten näin sen avulla saadaan L-askorbiinihapolle ominainen fysiologinen vaikutus.

(4) Se on erittäin turvallinen, koska se on syntetisoitu ja se metaboloituu nautittaessa in vivo L-askorbiinihapoksi ja α-glukosyylisakkaridiksi.

(5) Se on olennaisesti ei-hygroskooppinen tai tuskin lainkaan hygroskooppinen, mutta se on erittäin hyvin liukeva veteen. Näiden ominaisuuksien vuoksi sitä käytetään edullisesti C-vitamiinin rikastukseen, makua parantavana, happamuutta säätävänä ja stabilointiaineena elintarvikkeissa ja juomissa, jauheissa, rakeissa ja tableteissa, kuten vitamiinivalmisteissa, kreemitäytteissä, suklaassa purukumissa, pikajuomissa ja kastikeseoksissa.

(6) Se on olennaisesti ei-hygroskooppinen tai tuskin lainkaan hygroskooppinen, vapaasti valuva, kovettumaton tuote. Siten sitä on huomattavasti helpompi käsitellä kuin amorfista tuotetta ja tämä vaikuttaa huomattavasti materiaali- ja työkustannusten alenemiseen pakkaus-, kuljetus- ja varastointivaiheissa.

Näiden ominaisuuksien vuoksi 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa voidaan edullisesti lisätä stabilointiaineeksi, laatua parantavaksi aineeksi, uv-absorbentiksi ja kosmeettisten tuotteiden (ihonhoito- ja ihonvalkaisuaineet) yhteen tai useampaan aineosaan sekä myös aineisiin, joiden tarkoituksena on rikataa tuote erittäin turvallisella luonnon C-vitamiinilla. Tässä tapauksessa yhdessä kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon kanssa käytetään edullisesti L-askorbiinihappoa,

E-vitamiinia, rutiinia, α-glukosyylirutiinia ja/tai hesperidiiniä.

Koska 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo on erittäin hapon- ja kuumuudenkestävä ja koska se sopii yhteen erilaisten happamien, suolaisten, kitkerien, makeiden ja kutistavien aineiden kanssa, sitä käytetään edullisesti C-vitamiinilisäyksenä, makua parantavana aineena, hapetuksenestoaineena ja laatua parantavana aineena elintarvikkeissa ja juomissa yleisesti; esimerkkejä ovat: maustekastikkeet kuten soijakastike, soijakastikejauhe, miso, misojauhe, "moromi", "hishio", "furikake", majoneesi, salaattikastike, viinietikka, "sanbai-zu", "funmatsu-sushi-su", "chuka-no-moto", (tensuya (tenpurakastike)", "mentsuyu (japanilainen makaronikastike)", Worcester-kastike, ketchup, "yakiniku-no-tare (grillilihakastike)", curry roux, paistikastikejauhe, keittojauheet, "dashi-no-moto", maustekastikeseokset, "mirin (erittäin makea sake)", hienosokeri ja palasokeri, japanilaiset leivonnaiset kuten "senbei (riisicrackerit)", "arare (pelletin muotoinen senbei)", "okoshi (hirssi-riisicrackerit)", "karinto (rasvassa keitetty leivonnainen)", "gyuhi (tärkkelystahna)", riisitahna, "manju (papumarmeladitäytteinen pulla)", "uiro (makea riisihyytelö)", "an (papumarmeladi)", "yokan (makea papuhyytelö)", "mizu-yokan (pehmeä adzuki-papuhyytelö)", "kingyoku", hyytelö, castella ja "amedama (japanilainen toffee)"; länsimaiset leivonnaiset ja makeiset kuten pullat, keksit, crackerit, piirakat, vanukkaat, tuulihatut, vohvelit, sienikakut, donitsit, suklaa, purukumi, karamellit ja makeiset; jäädytetyt jälkiruoat kuten jäätelö ja sorbetti; siirapit kuten hedelmäsäilykkeissä käytetyt siirapit "kaki-gori (jäälastut)", levitteet ja tahnat kuten voikreemi, custard-kastike, jauhotahna ja hedelmätahna; hedelmävalmisteet kuten hedelmäsose, marmeladi, siirapin kanssa säilötyt hedelmät ja kuivatut sokeroidut hedelmät; ruokavalmisteet kuten hedelmistä ja vihanneksista valmis-

tetut tuotteet; viljatuotteet kuten leipomotuotteet, makaronit, vermisellit, keitetty riisi ja synteettinen liha; rasvaelintarvikkeet kuten salaattiöljy ja margariini; etikkasäilykkeet kuten "fukujin-zuke (vihannesviipaleita soijakastikkeessa)", "bettara-zuke (retiisipikkelsi)" ja "hakusai-zuke-no-moto"; lihatuotteet kuten kinkku ja makkarat; kalatuotteet kuten kalanlihakinkku, kalamakkara, "kamaboko (keitetty kalatahna)", chikuwa (tarkka käännös: bambupyörät)" ja "hanpen"; alkupalat kuten "uni-no-shiokara (suolattu merisiilinsuoli)", "ika-no-shiokara (suolattu kalmarinsuoli)", "su-konbu", "saki-surume" ja "fugu-no-mirinboshi"; tsukudanit (soijakastikkeessa keitetyt elintarvikkeet) kuten "nori (kuivattu merilevä)", "sansai (vuoristovihannekset)", surume (kuivattu kalmari)", pikkukalat ja äiriäiset; arkiruoat kuten "nimame (keitetyt pavut)", perunasalaatti, "kombuki-maki (ruskolevärulla)" ja "tempura (pakasteruoat)"; muna- ja maitotuotteet kuten "kinshi-tamago", maitojuomat, voi ja juusto; pullotetut ja purkitetut tuotteet kuten liha-, kalanliha-, hedelmä- ja vihannessäilykkeet; alkoholijuomat kuten synteettinen sake, "zojo-shu", liköörit, viinit ja whisky; juomat kuten kahvi, kaakao, mehu, hiilihappoiset juomat, maitohappojuomat ja lactobacillus-juomat; ja esiseos- ja instant-valmisteet kuten vanukasjauheet, kuumakakkuesiseos, pikamehu, pikakahvi, "sokuseki-shiruko (adzuki-papukeittoesiseos, jossa riisikakkuja)" ja pikakeittojauhe. Edelleen kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa voidaan edullisesti lisätä kotieläinten ja siipikarjan rehuihin ja lemmikkieläinten ruokiin, myös mehiläisten, silkkiperhosen toukkien ja akvaariokalojen ruokiin C-vitamiinilisäykseksi ja näiden ruokien makua ja hapetuksenkestoa parantamaan.

2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoavoidaan myös edullisesti lisätä erityisruokiin ja -juomiin, joita käytetään kosmetiikkatuotteisiin, kuten ihonhoitoaineisiin ja ihonvalkaisuaineisiin; esimerkkejä tällaisista

tuotteista ovat sikarit, savukkeet, trokeet, kalanmaksaöljy, suun kautta otettavat virkistysaineet, hengityksen raikastamispastillit, suuvedet, intubaatioravintoaineet, hammastahna, huulipuna, luomivärit, maitomaiset ihovoiteet, kosteuttava ihovesi, ihovoide, pohjavoide, auringonsuojavoide, ihonhoitosaippua, shampoo ja huuhteluaine; lisäksi sitä voidaan käyttää uv-absorbenttina ja hajoamista ehkäisevänä aineena muoveissa sekä myös substraattina glykosidihydrolaasien määrityksissä.

Kiteinen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo sisällytetään tuotteisiin tavallisella tavalla, esimerkiksi sekoittamalla, vaivaamalla, liuottamalla, sulattamalla, kastamalla, imeyttämällä, levittämällä, sivelemällä, päällystämällä, suihkuttamalla, injektoimalla, kiteyttämällä ja saostamalla ennen tuotteiden valmistusprosessin päättymistä.

Kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa käytetään edullisesti aineksena sellaisissa kemiallisissa reaktioissa, jotka suoritetaan vedettömissä olosuhteissa, koska se on käytännöllisesti katsoen vedetöntä ja se saadaan täysin vedetömäksi puhaltamalla sitä jonkin aikaa kuumalla ilmalla. siten käyttämällä kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa tavanomaiseen kemialliseen reaktioon vedettömissä olosuhteissa voidaan helposti valmistaa esimerkiksi sen eetteri- ja esterijohdannaisia. Näitä johdannaisia käytetään edullisesti esimerkiksi pinta-aktiivisissa aineissa, emulgointiaineissa, stabilointiaineissa ja lipofiilisena C-vitamiinina.

Vapaassa happomuodossa oleva kiteinen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo voidaan tarvittaessa muuttaa esimerkiksi natriumsuolaksi, kalsiumsuolaksi, magnesiumsuolaksi, rautasuolaksi, kuparisuolaksi tai sinkkisuolaksi saattamalla se reagoimaan vastaavan metallihydroksidin tai metallikarbonaatin vesiliuoksen kanssa, jolloin saadaan tuote, jolla voidaan sopivasti säätää pH-arvoa ja jolla on sekä mineraalien että C-vitamiinin ominaisuudet.

Tällaista ainetta käytetään edullisesti ravinnon rikastusaineissa ja kemiallisissa aineissa.

Seuraavat kokeet kuvaavat yksityiskohtaisesti keksinnön mukaista tyypillistä kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa.

Koe 1

Kiteisen2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon valmistus

Yhdeksän paino-osaa dekstriiniä (DE noin 6) liuotettiin kuumentaen 15 paino-osaan vettä ja liuokseen lisättiin pelkistävissä olosuhteissa 3 paino-osaa L-askorbiinihappoa ja sitten 400 yksikköä/g dekstriiniä syklomaltodekstriiniglukanotransferaasia (Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japani) ja seoksen annettiin reagoida 14 tuntia 60 °C:ssa ja pH-arvossa 5,5. Reaktioseos syötettiin "AQ-303 ODS" HPLC-systeemiin (Yamamura Chemical Laboratories Co., Ltd., Kioto, Japani), joka oli varustettu "LC-6"-kolonnilla (Shimadzu Seisakusho Ltd., Kioto, Japani) ja eluoitiin 0,1-m KH_2PO_4-H_3PO_4-puskurilla (pH 2,0) virtausnopeudella 0,5 ml/min käyttäen tarkkailuun "Mult-340"-detektorisysteemiä (Japan Spectroscopic Co., Ltd., Tokio, Japani). Tulokseksi saatiin L-askorbiinihappoa 9,5 minuutin retentioajan jälkeen ja vastamuodostuneita α-D-glykosyyli-L-askorbiinihappoa, α-D-maltosyyli-L-askorbiinihappoa, α-D-maltotriosyyli-L-askorbiinihappoa, α-D-maltotetrosyyli-L-askorbiinihappoa, α-D-maltopentosyyli-L-askorbiinihappoa, α-D-maltoheksosyyli-L-askorbiinihappoa ja α-D-maltoheptosyyli-L-askorbiinihappoa vastaavasti 11,2 minuutin, 15,7 minuutin, 20,6 minuutin, 24,9 minuutin, 28,1 minuutin, 32,1 minuutin ja 38,6 minuutin retentioajan jälkeen. Noin 60 % L-askorbiinihaposta oli muuttunut α-glykosyyli-L-askorbiinihapoksi. Sitten reaktioseos suodatettiin UF-membraanilla entsyymin poistamiseksi, pH säädettiin 5,0:ksi ja lämpötila 55 °C:seen ja seokseen lisättiin 10 yksikköä/g dekstriiniä glukoamylaa-

sia (EC 3.2.1.3) (Seikagaku Kogyo Ltd., Tokio, Japani) ja seoksen annettiin reagoida 24 tuntia. Reaktioseoksen HPLC-analyysi osoitti, että α-D-maltosyyli-L-askorbiinihappo ja korkeammat α-glykosyyli-L-askorbiinihapot olivat hydrolysoituneet 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapoksi.

Sitten reaktioseosta kuumennettiin jäljellä olevan entsyymin inaktivoimiseksi, seosta käsiteltiin värinpoistohiilellä, hiili suodatettiin ja suodos konsentroitiin noin 50-paino/paino-%:iseksi.

Konsentraatti kromatografoitiin kolonnissa, jossa oli "XT-1016 (Na^+-muoto) -hartsia", joka on vahvasti hapan kationinvaihtaja (Tokyo Chemical Industries, Tokio, Japani), jokin verran modifioiden menetelmää, joka on esitetty JP-hakemusjulkaisussa 23 799/83, jolloin eluoitui ja otettiin talteen puhtausasteeltaan noin 94-%:inen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappofraktio, joka sitten puhdistettiin demineralisoimalla kationinvaihtajahartsilla (H^+-muoto), konsentroitiin noin 80-paino/paino-%:ksiseksi, pantiin lasiastiaan, jossa sen annettiin seistä 20 - 35 °C:ssa noin yhden kuukauden ajan. Tällöin tapahtui kiteytymistä. Osa kiteistä lisättiin toiseen vastavalmistettuun erään samaa puhdistettua ja konsentroitua 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappofraktiota ja tuote kiteytettiin sekoittamalla hiljalleen. Saatu kidemassa erotettiin melassiksi ja kiteiksi ja paremman puhtausasteen saamiseksi kiteet pestiin suihkuttamalla niille hieman jäähdytettyä vettä, liuottamalla kiteet veteen ja kiteyttämällä uudestaan. Näin saatiin erittäin puhtaita kiteistä, joiden puhtausaste oli noin 99,9 % ja enemmän.

Koe 2

Kiteisen2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

Kokeen 1 menetelmällä uudelleenkiteyttämällä saatujen kiteiden ominaisuudet osoittivat, että kyseessä oli uusi vedetön kiteinen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo.

Kiteiden ominaisuuksia kuvataan seuraavassa.

(1) Alkuaineanalyysi kaavalle $C_{12}H_{18}O_{11}$)

Saatu: C = 42,6 H = 5,36 %

Laskettu: C = 42,4 H = 5,37 N < 0,01 %

(2) Molekyylipaino

FD-massaspektrometrianalyysissä "M-80B"-massaspektrometrillä (Hitachi Ltd., Tokio, Japani) saatiin $(M + H)^+$-piikki kohdassa 339 (kemiallisesta kaavasta $C_{12}H_{18}O_{11}$ lasketu molekyylipaino on 338).

(2) Sulamispiste

158,5 - 159,5 °C

(4) Liukenemislämpö

Endoterminen (27,2 kcal/g)

(5) Ominaiskiertokyky

$[\alpha]_D^{20}$ = +189,6° (H_2O, pH 1,98)

$[\alpha]_D^{20}$ = +246,3° (H_2O, pH 7,10)

(6) av-absorptiospektri

uv-absorptiospektri määritettiin 50 µm liuoksessa. pH-arvossa 2,0 määritetty spektri nähdään kuviossa 1 ja pH arvossa 7,0 määritetty spektri kuviossa 2.

(max) = 238 nm, = 0,93 x 10^4 (pH 2,0)

(max) = 260 nm, = 1,50 x 10^4 (pH 7,0)

(7) Infrapuna-absorptiospektri

Käytettiin KBr-tablettia. Kiteen IR-spektri nähdään kuviossa 3 ja kontrollina käytetyn amorfisen yhdisteen IR-spektri nähdään kuviossa 4.

(8) Liukoisuus

125 g kiteitä liukenee 100 g:aan vettä 25 °C:ssa.

(9) Liukoisuus liuottimiin

Liukenee hyvin veteen, 0,1-n NaOH-liuokseen ja 0,1-n etikkahappoon; liukenee metanoliin ja etanoliin ja on liukenematon eetteriin, bentseeniin, kloroformiin ja etyyliasetaattiin.

(10) Dissosiaatiovakio

pKa on 3,0. Kun verrataan tätä arvoihin, joita erilaisille L-askorbiinihapon johdannaisille on ilmoitettu

kirjallisuudessa: J. Jernow et al., Tetrahedron, vol. 35, sivut 1483 - 1486 (1979), taulukko 1 ja Pao-Wen Lu et al., Journal of Agricultural Food Chemistry, vol. 32, sivut 21 - 28 (1948), taulukko 2, voidaan päätellä, että keksinnön mukaisessa yhdisteessä α-D-glukosyylisidos on askorbiinihapporyhmän hiilessä nro 2 olevassa alkoholiryhmässä ja alkoholiryhmä hiilessä nro 3 on vapaa.

(11) Metylointianalyysi

Kiteet metyloitiin menetelmällä, jonka Pao-Wen Lu et al., Journal of Agricultural Food and Chemistry, vol. 32, sivut 21 - 28 (1984), ovat kuvanneet, jossa menetelmässä L-askorbiinihappoa metyloitiin diatsometaanilla pääasiassa 3-O-metyyli-L-askorbiinihapoksi. Hydrolysoimalla saatiin pääasillisina tuotteina 3-O-metyyli-L-askorbiinihappoa ja D-glukoosia.

(12) Fysikaaliset ominaisuudet ja väri

Värittömiä läpikuultavia kiteitä. Jauhettuina kiteet maistuvat happamilta, ne ovat kuitenkin hajuttomia. Ne eivät ole hygroskooppisia eivätkä ne nesteydy. Painohäviö kuumennettaessa kaksi tuntia 130 °C:ssa on alle 0,5 paino/paino-%.

Kuviossa 5 nähdään ylikyllästetyssä liuoksessa kasvavan kiteen mikroskooppikuva.

(13) Värireaktio

Ei osoita suoraa pelkistysaktiivisuutta eikä pelkistä 2,6-dikloorifenoli-indofenolia, jonka väri säilyy.

Negatiivinen reaktio 2,4-dinitrofenyylihydratsiinin kanssa.

Muuttuu vihreäksi antroni-rikkihapporeaktiossa.

(14) Rakenne-elementit

Hydrolysoituu α-glukosidaasin vaikutuksesta tai käsittelemällä 1-n HCl-liuoksella 100 °C:ssa viisi minuuttia, jolloin saadaan L-askorbiinihappoa ja D-glukoosia moolisuhteessa 1:1.

(15) Röntgen-diffraktio-jauheanalyysi

Röntgen-diffaktio-jauheanalyysillä käyttäen "Geigerflex Rad-II B (CuKα-säde)" -laitetta (Rigaku Corp., Tokio, Japani) kiteiden pääasialliset diffraktiokulmat (2θ) ovat 10,3°, 14,8°, 16,2°, 18,4° ja 24,5°.

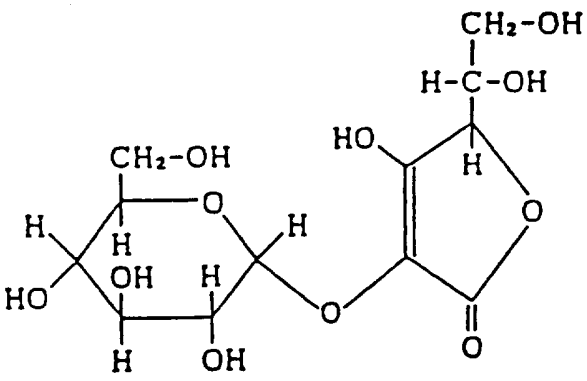
(16) Yksittäisen kiteen röntgenanalyysi

Yksittäisellä kiteellä ylikyllästetyssä liuoksessa suoritetulla röntgen-diffraktioanalyysillä todettiin, että kide kuului ortorombiseen kidejärjestelmään ja sen alkeiskoppi oli $P2_12_12_2$, jonka hilavakiot olivat a = 11,929 Å, b = 24,351 Å ja c = 4,864 Å ($\alpha = \beta = \ = 90°$).

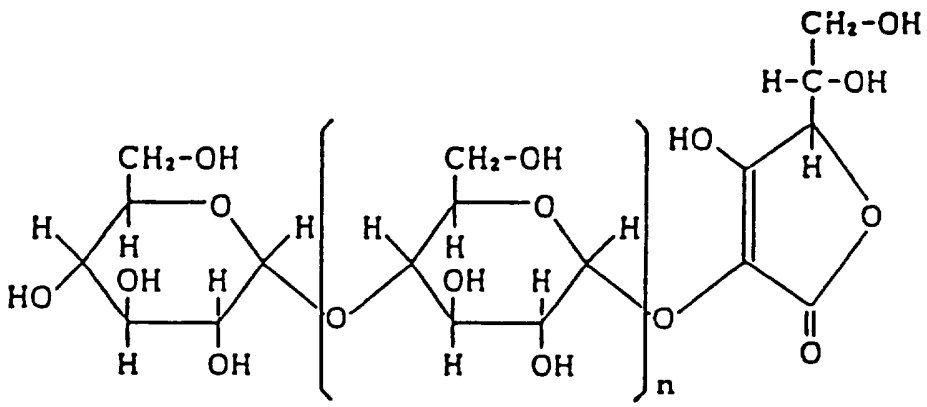
Nämä tiedot osoittavat, että kiteen kemiallinen rakenne sisältää α-glukosyylisidoksen hiiliatomin nro 2 alkoholiryhmän ja D-glukoosin hiiliatomin nro 1 alkoholiryhmän välillä.

Kuviossa 6 nähdään kiteen ORTEP-kuva.

Edellä esitetyt tiedot osoittavat, että uuden kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon kaava on (III):



Näin ollen on ehdotettu, että α-glykosyyli-L-askorbiinihapolla, jossa L-askorbiinihappoon on liittynyt ekvimolaarinen määrä tai enemmän D-glukoosiryhmiä, on seuraava kemiallinen rakennekaava (IV):



jossa n on kokonaisluku 0 - 6.

Koe 3

Kiteisen2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon pysyvyys liuoksessa

2-O-α-D-glukosyyli-L-askorbiinihapon pysyvyyttä vesiliuoksessa verrattiin JP-patenttijulkaisussa 38 158/73 esitetyn 6-O-α-D-glukosyyli-L-askorbiinihapon ja L-askorbiinihapon vastaavaan pysyvyyteen. Tällöin kustakin näytteestä valmistettiin liuos, jonka konsentraatio oli 70 µmol ja pH-arvo 7,0 tai 2,0, liuos pantiin kyvettiin, jossa sen absorbanssi mitattiin lämpötilassa 45 °C aaltopituudella 260 nm pH 7:ssä ja 245 nm pH 2,0:ssä. Jäljellä oleva suhde (%) laskettiin absorbanssista. Tulokset on esitetty taulukossa I.

Kuten taulukon I tuloksista huomataan, kiteinen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo on erityisen pysyvä vesiliuoksessa päinvastoin kuin 6-O-α-D-glukosyyli-L-askorbiinihappo ja L-askorbiinihappo.

Taulukko I

pH		Aika (tunteja)					
		0	1	2	4	18	24
	2GAsA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
7	6GAsA	100%	88%	72%	43%	7%	4%
	AsA	100%	80%	61%	32%	1%	1%
	2GAsA	100%	100%	100%	100%	100%	100%
2	6GAsA	100%	99%	98%	90%	25%	12%
	AsA	100%	98%	95%	88%	12%	4%

Huom: 2GAsA on keksinnön mukaisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon symboli; 6GAsA on vertailuna käytetyn 6-O-α-D-glukosyyli-L-askorbiinihapon symboli ja AsA on toisen vertailuyhdisteen, L-askorbiinihapon symboli.

Koe 4

Akuutti myrkyllisyys

Kokeen 1 menetelmällä valmistettua kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa annettiin suun kautta seitsemän viikon ikäisille dd-hiirille akuutin myrkyllisyyden testaamiseksi. Tulokseksi saatiin, etteivät hiiret kuolleet annoksilla aina 5 g:aan asti, sitä suuremmat annokset aiheuttivat vaikeuksia.

Nämä tulokset osoittivat näytteiden olevan erittäin vähän myrkyllisiä.

Seuraavat esimerkit A ja B kuvaavat kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa ja sen käyttöä.

Esimerkki A-1

Kiteinen2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo

Yhdeksän paino-osaa α-syklodekstriiniä liuotettiin kuumentamalla 20 paino-osaan vettä ja liuokseen lisättiin pelkistävissä olosuhteissa 3 paino-osaa L-askorbiinihappoa, sitten liuokseen lisättiin pH-arvossa 5,5 ja lämpötilassa 65 °C 100 yksikköä/g α-syklodekstriiniä syklomaltodekstriiniglukanotransferaasia (Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japani) ja seoksen annettiin reagoida 40 tuntia. Reaktioseoksen HPLC-analyysi osoitti, että noin 50 % L-askorbiinihaposta oli samoin kuin kokeessa 1, muuttunut α-glykosyyli-L-askorbiinihapoksi.

Tämän jälkeen reaktioseosta kuumennettiin jäljellä olevan entsyymin inaktivoimiseksi, seoksen pH säädettiin 4,5:ksi ja lämpötila 55 °C:seen ja seokseen lisättiin 50 yksikköä/g α-syklodekstriiniä glukoamylaasia ja seoksen annettiin reagoida 24 tuntia. Nyt saadun reaktioseoksen HPLC-analyysi osoitti, että α-maltosyyli-L-askorbiinihappo ja korkeammat α-glykosyyli-L-askorbiinihapot olivat hydrolysoituneet 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapoksi.

Sitten reaktioseosta kuumennettiin jäljellä olevan entsyymin inaktivoimiseksi, seosta käsiteltiin aktiivihiilellä värin poistamiseksi, hiili suodatettiin ja suodos vietiin kationista ioninvaihtajahartsia (H^+-muoto) sisältävään kolonniin, jossa se demineralisoitiin ja sitten anionista ioninvaihtajahartsia (OH^--muoto) sisältävään kolonniin, jossa se demineralisoitiin ja sitten anionista ioninvaihtajahartsia (OH^--muoto) sisältävään kolonniin anionien absorboimiseksi. Tämän jälkeen kolonni pestiin vedellä ja eluoitiin 0,5-n HCl-liuoksella, eluaatille suoritettiin geelisuodatuskromatografia "HW-40":llä (geelituote, jota toimittaa Tosoh Corp., Tokio, Japani), jolloin saatiin 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa sisältävä fraktio, joka konsentroitiin vakuumissa noin 73-paino/paino-%:iseksi, pantiin kiteyttimeen, jossa siihen lisättiin

2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon kideytimiä, lämpötila säädettiin 40 °C:ksi ja alennettiin sitten vähitellen kahden vuorokauden kuluessa 25 °C:seen samalla hiljalleen sekoittaen, sitten kidemassa siirrettiin korityyppiseen sentrifugiin melassin erottamiseksi. Saadut kiteet pestiin pienellä määrällä vesipitoista etanolia, jolloin saatiin puhtausasteeltaan noin 99-%:ista kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa saannolla noin 35 paino/paino-% lähtöaineena käytetystä L-askorbiinihaposta laskettuna.

Vaikka tuotteen sulamispiste ja ominaiskierto olivat jonkin verran erilaiset kuin kokeessa 1 valmistetulla kiteisellä tuotteella, niin muut ominaisuudet olivat olennaisesti samat.

Tuote on olennaisesti ei-hygroskooppinen, helposti käsiteltävä, sillä ei ole suoraa pelkistysaktiivisuutta ja sen pysyvyys ja fysiologiset vaikutukset ovat korkeat. Täten tuotetta käytetään edullisesti makua parantavana aineena, happamuutta lisäävänä aineena, fysiologisesti aktiivisena aineena, stabilointiaineena, laatua parantavana aineena, uv-absorbenttina, farmaseuttisena aineena ja kemikaalina elintarvikkeissa, juomissa, käsittelyyn reagoivien sairauksien lääkkeissä, kosmettisissa tuotteissa ja kemiallisissa reagensseissa sekä myös valmisteissa, joiden tarkoituksena on lisätä C-vitamiinia.

Esimerkki A-2

Kiteinen2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo

30 paino-osaa dekstriiniä (DE noin 6) liuotettiin kuumentaen 40 paino-osaan vettä ja liuokseen lisättiin pelkistävissä olosuhteissa 7 paino-osaa L-askorbiinihappoa, sitten liuokseen lisättiin 60 °C:ssa pH-arvossa 5,6 250 yksikköä/g dekstriiniä syklodekstriiniglukanotransferaasia ja seoksen annettiin reagoida 40 tuntia. Reaktioseoksen HPLC-analyysi, joka suoritettiin samoin kuin esimerkissä A-1, osoitti, että noin 65 % L-askorbiinihaposta

oli muuttunut α-glykosyyli-L-askorbiinihapoksi samoin kuin kokeessa 1.

Tämän jälkeen reaktioseos suodatettiin UF-membraanilla entsyymin poistamiseksi, pH säädettiin 5,0:ksi ja lämpötila 50 °C:seen ja seokseen lisättiin 100 yksikköä/g dekstriiniä glukoamylaasia ja seoksen annettiin reagoida kuusi tuntia. Reaktioseoksen HPLC-analyysi osoitti, että α-D-maltosyyli-L-askorbiinihappo ja korkeammat α-glykosyyli-L-askorbiinihapot olivat muuttuneet 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapoksi.

Sitten reaktioseosta kuumennettiin jäljellä olevan entsyymin inaktivoimiseksi, seos suodatettiin ja suodos konsentroitiin ja kromatografoitiin "Dowex 50WX4 (Ca^{++}-muoto)" -kolonnissa (vahvasti hapan kationinvaihtajahartsi, valmistaja: Dow Chemical Co., Midland, Michigan, USA) kokeessa 1 esitetyllä menetelmällä, jota oli jonkin verran modifioitu. Eluoitu 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa sisältävä fraktio puhdistettiin demineralisoimalla kationinvaihtajahartsilla (H^+-muoto), konsentroitiin vakuumissa noin 77-paino/paino-%:iseksi, pantiin kiteyttimeen, siihen lisättiin 2 paino/paino-% kideytimiä, lämpötila säädettiin 45 °C:seen ja seosta sekoitettiin hiljalleen kaksi vuorokautta antaen lämpötilan asteittain alentua 28 °C:seen. Saatu kidemassa erotettiin samoin kuin esimerkissä 1, jolloin saatiin 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa, jonka puhtausaste oli noin 98 % ja saanto noin 45 paino/paino-% lähtöaineena käytetystä L-askorbiinihaposta laskettuna.

Samoin kuin Esimerkin A-1 tuote, saatu tuote on olennaisesti ei-hygroskooppinen, helposti käsiteltävä tuote, jolla ei ole suoraa pelkistysaktiivisuutta ja jonka pysyvyys ja fysiologinen aktiivisuus on tyydyttävän korkea. Täten tuotetta voidaan edullisesti käyttää makua parantavana aineena, happamuutta lisäävänä aineena, kosteutta säilyttävänä aineena, stabilointiaineena, laatua paran-

tavana aineena, hapetuksenestoaineena, biologisesti aktiivisena aineena, uv-absorbenttina, kemikaalina elintarvikkeissa, juomissa ja kosmeettisissa tuotteissa sekä myös valmisteissa, joiden tarkoituksena on olla C-vitamiinilisänä.

Esimerkki A-3

Kiteinen2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo

Samoin kuin esimerkissä A-2, syklomaltodekstriiniglukanotransferaasin ja glukoamylaasin annettiin vaikuttaa reaktioseokseen, jolloin saatiin 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa sisältävä seos, seosta kuumennettiin entsyymien inaktivoimiseksi, käsiteltiin aktiivihiilellä värin poistamiseksi ja hiili suodatettiin. Saatu suodos demineralisoitiin kationinvaihtajahartsilla (H^+-muoto) ja kromatografoitiin kolonnissa, joka sisälsi vahvasti hapanta kationinvaihtajahartsia (H^+-muoto) esimerkissä 1 kuvatulla menetelmällä, jota hieman muunnettiin. Eluaattina saatu 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa sisältävä fraktio otettiin talteen, konsentroitiin 90-paino/paino-%:iseksi, pantiin kiteyttimeen, jossa siihen lisättiin noin 2 paino/paino-% kideytimiä ja sitä sekoitettiin hiljalleen 30 minuuttia, minkä jälkeen seos siirrettiin tarjottimelle, jossa sen annettiin kiteytyä ja muuttua kiinteäksi kolmen vuorokauden aikana 25 °C:ssa. Kiinteä aines poistettiin tarjottimelta, syötettiin jauhinlaitteeseen ja kuivattiin, jolloin saatiin kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa, jonka puhtausaste oli noin 95 % ja saanto noin 70 paino/paino-% lähtöaineena käytetystä askorbiinihaposta laskettuna.

Samoin kuin esimerkin A-1 tuote, saatu tuote on olennaisesti ei-hygroskooppinen, helposti käsiteltävä tuote, jolla ei ole suoraa pelkistysaktiivisuutta ja jonka pysyvyys ja fysiologinen aktiivisuus on tyydyttävän korkea. Täten tuotetta voidaan edullisesti käyttää makua parantavana aineena, happamuutta lisäävänä aineena, stabi-

lointiaineena, laatua parantavana aineena, glukosyyleina, biologisesti aktiivisena aineena, uv-absorbenttina, kemikaalina elintarvikkeissa, juomissa, kosmeettisissa tuotteissa sekä myös valmisteissa, joiden tarkoituksena on olla C-vitamiinilisänä.

Esimerkki A-4

Kiteinen2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo

Esimerkin A-3 menetelmällä valmistettu 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa sisältävä fraktio konsentroitiin noin 80-paino/paino-%:iseksi, pantiin kiteytimeen, jossa siihen lisättiin noin 2 paino/paino-% kideytimiä ja jossa se asteittain jäähdytettiin 50 °C:seen samalla edistäen kiteytymistä hiljalleen sekoittamalla. Saatu kidemassa, jonka kiteisyys oli noin 35 %, sumutettiin sumutetornista 1,5 mm läpimittaisen suuttimen kautta suurpainepumpulla paineella 150 kg/cm^2.

Samanaikaisesti tornin yläpäästä johdettiin 80 °C:ista ilmaa tornin alaosassa olevaa verkkokuljetinta kohti, jolle kuljettimelle jauhemainen tuote koottiin; saatu kiteinen jauhe kuljetettiin vähitellen pois tornista noin 30 minuutin kuluessa samalla kun verkon lävitse johdettiin 40 °C:einen ilmavirta.

Kiteinen jauhe vietiin sitten vanhennustorniin, jossa sen annettiin vanheta 10 tuntia, jona aikana tapahtui kiteytymistä ja veden poistumista. Näin saatiin kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa, jonka puhtausaste oli noin 95 % ja saanto noin 70 paino/paino-% lähtöaineena käytetystä L-askorbiinihaposta laskettuna.

Samoin kuin esimerkin A-1 tuote saatu tuote on olennaisesti ei-hygroskooppinen, helposti käsiteltävä tuote, jolla ei ole suoraa pelkistysaktiivisuutta ja jonka pysyvyys ja fysiologinen aktiivisuus on tyydyttävän korkea. Täten tuotetta voidaan edullisesti käyttää makua parantavana aineena, happamuutta lisäävänä aineena, stabi-

lointiaineena, laatua parantavana aineena, hapetuksenestoaineena, biologisesti aktiivisena aineena, uv-absorbenttina, kemikaalina elintarvikkeissa, juomissa, kosmeettisissa tuotteissa sekä myös valmisteissa, joiden tarkoituksena on olla C-vitamiinilisänä.

Esimerkki A-5

Esimerkki A-5(1)

α-glukosidaasin valmistus

Mucor javanicus IFO 4570 ympättiin kasvualustalle ja viljeltiin 30 °C:ssa 44 tuntia ilmastoidussa ja sekoitetussa nestemäisessä viljelyväliaineessa (500 painoosaa), joka sisälsi vettä ja 4,0 paino/til.-% maltoosia, 0,1 paino/til.-% yksiemäksistä kaliumfosfaattia, 0,1 paino/til.-% ammoniumnitraattia, 0,05 paino/til.-% magnesiumsulfaattia, 0,05 paino/til.-% kaliumkloridia, 0,2 paino/til.-% polypeptonia ja 1 paino/til.-% kalsiumkarbonaattia, jotka aineosat oli steriloitu ja steriilisti lisätty veteen välittömästi ennen ymppäämistä. Viljelyn päätyttyä huovasto otettiin talteen ja immobilisoitiin tavallisella tavalla.

Esimerkki A-5(2)

Kiteisen2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon valmistus

40 paino-osaa "Sunmaltia^{R}" (kiteinen maltoosi, jota markkinoi Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japani) liuotettiin kuumentamalla 70 paino-osaan vettä ja liuokseen lisättiin pelkistävissä olosuhteissa 10 paino-osaa L-askorbiinihappoa ja sen jälkeen 10 yksikköä/g maltoosia esimerkin A-5(1) mukaisesti valmistettua immobilisoitua α-glukosidaasia ja seoksen annettiin reagoida 50 °C:ssa pH-arvossa 5,5 kolme tuntia valolta suojattuna.

Yksi α-glukosidaasiyksikkö määritellään entsyymimääräksi, joka vapauttaa 1 µmoolin glukoosia 37 °C:ssa yhden minuutin aikana kokeessa, joka suoritetaan seuraavissa olosuhteissa. Sopivasti laimennettua entsyymiliuosta

lisätään 100 µl liuokseen, joka sisältää 250 µl 4-paino/til.-%:ista maltoosia ja 750 µl 0,1-m asetaattipuskuria (pH 6,0), joka sisältää 1,35 mM EDTA ja seoksen annetaan reagoida 37 °C:ssa 30 minuuttia, sitä inkuboidaan kiehuvassa vedessä kolme minuuttia reaktioseoksen suspendoimiseksi ja sitten lingotaan. Tämän jälkeen päällä olevasta nesteestä otetaan 20 µl:n näyte, johon lisätään 1 ml "Glukose B test" -reagenssia (glukoosioksidaasimenetelmässä käytettävä värireagenssi, jota markkinoi Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japani), seosta inkuboidaan 37 °C:ssa 20 minuuttia ja kehittyneen värin absorbanssi mitataan aaltopituudella 505 nm.

Tämän jälkeen reaktioseoksesta suodatettiin immobilisoitu α-glukosidaasi talteen käytettäväksi toisessa reaktioerässä. Suodosta käsiteltiin värinpoistohiilellä, hiili suodatettiin ja suodos kromatografoitiin vahvasti hapanta kationinvaihtajahartsia sisältävässä kolonnissa esimerkin A-2 menetelmällä, jolloin saatiin 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa sisältävä fraktio, joka puhdistettiin kationinvaihtajahartsilla esimerkin A-3 mukaisella menetelmällä, saatu liuos konsentroitiin vakuumissa noin 90-paino/paino-%:iseksi, pantiin kiteyttimeen, siihen lisättiin kideytimiä ja se kiteytettiin tarjottimella, kiinteä tuote syötettiin leikkaavaan jauhinlaitteeseen ja kuivattiin, jolloin saatiin kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa, L-askorbiinihappoa, jonka puhtausaste oli noin 88 % ja noin 20 paino/paino-% lähtöaineena käytetystä L-askorbiinihaposta laskettuna.

Kun tätä tuotetta verrataan esimerkin A-1 tuotteeseen, se on jonkin verran huonompi, se on kuitenkin olennaisesti ei-hygroskooppinen, helposti käsiteltävä tuote, jolla ei ole suoraa pelkistysaktiivisuutta ja jonka pysyvyys ja fysiologinen aktiivisuus on tyydyttävän korkea. Täten tuotetta voidaan edullisesti käyttää makua parantavana aineena, happamuutta lisäävänä aineena, stabilointi-

aineena, laatua parantavana aineena, hapetuksenestoaineena, uv-absorbenttina, kemikaalina elintarvikkeissa, juomissa, kosmeettisissa tuotteissa sekä myös valmisteissa, joiden tarkoituksena on olla C-vitamiinilisänä.

Esimerkki B-1

Purukumi

25 paino-osaa purukumiperusainetta ja 20 paino-osaa esimerkin A-2 menetelmällä valmistettua kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa vaivattiin yhteen 60 °C:ssa sekoittimessa ja seokseen lisättiin 50 paino-osaa vedetöntä kiteistä maltitolia ("Mabit^{R}, Hayashibara Shoji Inc., Okayama, Japani), 1,5 paino-osaa kalsiumfosfaattia ja 0,1 paino-osaa L-mentolia sisältävää ß-syklodekstriiniä sekä lisäksi vähäinen määrä makuainetta, seos valssattiin levyksi ja leikattiin otsikon mukaisiksi tuotteiksi. Tuote on C-vitamiinilla rikastettu, alhaiskariogeeninen ja alhaiskalorinen purukumi.

Esimerkki B-2

"Gyuhi (tärkkelystahna)"

Yksi paino-osa vahamaista riisitärkkelystä sekoitettiin 1,2 paino-osaan vettä ja seokseen lisättiin 1,5 paino-osaa sakkaroosia, 0,7 paino-osaa ß-maltoosia ("Sunmalt^{R}, Hayashibara Co. Ltd., Okayama, Japani), 0,1 paino-osaa esimerkin A-5 mukaisesti valmistettua kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa ja seos sekoitettiin homogeeniseksi samalla gelatinoiden kuumentamalla. Sitten saatu tuote muovattiin ja pakattiin tavallisella tavalla.

Saatu tuote (gyuhi) on C-vitamiinilla rikastettu japanilaistyylinen makeinen, jonka maku- ja purentaominaisuudet ovat erinomaiset ja joka muistuttaa "kibi-dangoa (hirssikokkare)". Tuotteen säilytyskestävyys on hyvä, koska sen hajaantuminen on tehokkaasti estetty.

Esimerkki B-3

Makeutusseos

Makeutusseos saatiin sekoittamalla yhteen 100 paino-osaa hunajaa, 50 paino-osaa isomeroitua sokeria, kaksi paino-osaa raffinoimatonta sokeria ("kurozato") ja yksi paino-osa esimerkin A-3 menetelmällä valmistettua kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa.

Tuote on C-vitamiinilla rikastettu makeutusaine, joka sopii terveysruokaan.

Esimerkki B-4

Suklaa

40 paino-osaa kaakaotahnaa, 10 paino-osaa kaakaovoita, 50 paino-osaa vedetöntä kiteistä maltitolia ja yksi paino-osa esimerkin A-2 mukaisesti valmistettua kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa sekoitettiin homogeeniseksi seokseksi ja seos syötettiin hienonnuslaitteeseen hiukkaskoon pienentämiseksi, siirrettiin sitten suklaamyllyyn, jossa sitä vaivattiin 50 °C:ssa kaksi vuorokautta. Vaivausvaiheessa lisättiin 0,5 paino-osaa lesitiiniä, joka dispergoitiin massaan homogeeniseksi. Tämän jälkeen massan lämpötila säädettiin lämpötilan säätimellä 31 °C:seen ja massa levitettiin muotteihin välittömästi ennen kaakaovoin kovettumista, ilma poistettiin tärryttimellä ja suklaa kovetettiin johtamalla jäähdytystunnelin (10 °C) lävitse 20 minuutin aikana. Suklaa poistettiin muoteista ja pakattiin, jolloin saatiin otsikon tuote.

Saatu tuote ei ole hygroskooppinen, sen väri, kiilto ja rakenne ovat erinomaiset, se sulaa suussa tasaisesti ja sen maku ja makeus ovat kohtuulliset ja pehmeät. Tuote on C-vitamiinilla rikastettu, alhaiskariogeeninen ja alhaiskalorinen suklaa.

Esimerkki B-5

Kreemitäyte

Kreemitäyte valmistettiin sekoittamalla homogeeniseksi seokseksi tavallisella tavalla 1 200 paino-osaa ki-

teistä α-maltoosia ("Finetose^{R}", Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japani), 1 000 paino-osaa rasvaa (shortening), 10 paino-osaa esimerkin A-4 mukaisesti valmistettua 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa, yksi paino-osa sitruunaöljyä ja yksi paino-osa vaniljaöljyä.

Tuote on C-vitamiinilla rikastettu kreemitäyte, jonka maku, aromi, sulamisominaisuudet ja tuntu suussa ovat erinomaiset.

Esimerkki B-12

Kylpyneste

Kylpyneste valmistettiin sekoittamalla 21 paino-osaa DL-natriumlaktaattia, kahdeksan paino-osaa natriumpyruvaattia, viisi paino-osaa esimerkin A-5 menetelmällä valmistettua kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappojauhetta ja 40 paino-osaa etanolia 26 paino-osaan puhdistettua vettä ja lisäämällä sopivia määriä väriä ja hajustetta.

Tuote sopii käytettäväksi ihonhoitoaineena ja ihon valkaisuaineena, joka käytössä laimennetaan 100 - 10 000-kertaisesti kylpyveteen. Tässä tapauksessa kylpyvesi voidaan korvata puhdistusnesteellä, kutistavalla aineella ja kosteuttavalla nesteellä.

Esimerkki B-13

Ihonhoitomaito

0,5 paino-osaa polyoksietyleenibehenyylieetteriä, yksi paino-osa polyoksietyleenisorbitolitetraoleaattia, yksi paino-osa öljyliukoista glyseryylimonostearaattia, 0,5 paino-osaa palorypälehappoa, 0,5 paino-osaa behenyylialkoholia, yksi paino-osa avokadoöljyä, yksi paino-osa esimerkin A-4 mukaisesti valmistettua kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa ja sopivat määrät E-vitamiinia ja antiseptistä ainetta liuotettiin tavallisella tavalla kuumentaen ja liuokseen lisättiin yksi paino-osa L-natriumlaktaattia, viisi paino-osaa 1,3-butyleeniglykolia, 0,1 paino-osaa karboksivinyylipolymeeria ja

85,3 paino-osaa puhdistettua vettä, seos emulgoitiin homogenisaattorin avulla ja siihen lisättiin sekoittaen sopiva määrä hajustetta, jolloin saatiin otsikon tuote.

Tuotetta voidaan edullisesti käyttää korkealaatuisena aurinkosuojamaitona, ihonhoitoaineena ja ihoa valkaisevana aineena.

Esimerkki B-14

Kosmettinen voide

Kaksi paino-osaa polyoksietyleeniglykolimonostearaattia, viisi paino-osaa itse-emulgoituvaa glyserolimonostearaattia, kaksi paino-osaa esimerkin A-3 mukaisesti valmistettua kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa, yksi paino-osa parafiiniöljyä, 10 paino-osaa glyseryylitrioktanaattia ja sopiva määrä antiseptista ainetta liuotettiin kuumentaen tavallisella tavalla ja seokseen lisättiin kaksi paino-osaa L-maitohappoa, viisi paino-osaa 1,3-butyleeniglykolia ja 66 paino-osaa puhdistettua vettä ja seos emulgoitiin homogenisaattorin avulla, siihen lisättiin sopiva määrä hajustetta ja sitä sekoitettiin, jolloin saatiin otsikon tuote.

Tuote on sopiva käytettäväksi korkealaatuisena aurinkosuojavoiteena, ihonhoitovoiteena ja ihoa valkaisevana voiteena.

Kuten edellä on kuvattu, keksinnön mukainen uusi yhdiste, kiteinen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa on olennaisesti ei-hygroskooppinen, ei nesteydy eikä kovetu eikä sillä ole suoraa pelkistysaktiivisuutta, se on helposti käsiteltävä, erittäin pysyvä ja helposti in vivo hydrolysoituva yhdiste, jolla on L-askorbiinihapolle ominaista hapetuksenestoaktiivisuutta ja fysiologista aktiivisuutta. Lisäksi 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo on erittäin turvallinen yhdiste, koska se syntetisoidaan ja metaboloituu in vivo.

Kiteinen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa voidaan helposti kiteyttää ylikyllästetystä liuoksesta

antamalla sakkaridinsiirtoentsyymin vaikuttaa yksin tai yhdessä glukoamylaasin kanssa liuokseen, joka sisältää L-askorbiinihappoa ja α-glukosyylisakkaridia ja puhdistamalla ja konsentroimalla saatu 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo. Kiteytysmenetelmä on siten taloudellisuuden kannalta ylivoimaisen edullinen ja tuotteen markkinointi on helppoa.

Koska kiteinen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo on tyydyttävän hyvin pysyvä ja fysiologisesti aktiivinen, sitä käytetään edullisesti stabilointiaineena, laatua parantavana aineena, hapetuksenestoaineena, fysiologisesti aktiivisena aineena, uv-absorbenttina, kemiallisena aineena elintarvikkeissa, kuten juomissa ja valmisruokatuotteissa, kosmetiikassa, kuten ihonhoitoaineissa ja ihon valkaisuaineissa. Siten kiteisellä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapolla on laajaa käyttöä ja sillä on suurta merkitystä näillä teollisuusaloilla.

Patenttivaatimukset

1. Kiteinen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kiteinen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo, jonka röntgendiffraktio-jauheanalyysillä määritetyt pääasialliset diffraktiokulmat (2θ) ovat 10,3°, 14,8°, 16,2°, 18,4° ja 24,5°.

3. Menetelmä kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo kiteytetään ylikyllästetystä liuoksestaan ja saatu kiteinen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo otetaan talteen.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ylikyllästetty liuos valmistetaan antamalla sakkaridinsiirtoentsyymin yksinään tai yhdessä glukoamylaasin kanssa vaikuttaa L-askorbiinihappoa ja α-glukosyylisakkaridia sisältävään liuokseen, jolloin muodostuu 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa ja ottamalla talteen ja puhdistamalla saatu 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu sakkaridinsiirtoentsyymi on syklomaltodekstriiniglukanotransferaasi (EC 2.4.1.19) tai α-glukosidaasi.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että α-glukosyylisakkaridi valitaan seuraavista: malto-oligosakkaridi, tärkkelyksen osittaishydrolysaatti, nesteytetty tärkkelys, gelatinoitu tärkkelys, liuennut tärkkelys ja näiden seokset.

7. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sakkaridinsiirtoentsyymiä käytetään määränä, joka saa aikaan täydellisen reaktion 3 - 80 tunnissa.

8. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että sakkaridinsiirtoentsyymin annetaan vaikuttaa liuokseen pH-arvossa 3 - 9 ja lämpötilassa 20 - 80 °C.

9. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että L-askorbiinihapon konsentraatio on vähintään 1 paino/paino-%.

10. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että α-glukosyylisakkaridin konsentraatio on 0,5 - 30-kertainen L-askorbiinihapon konsentraatioon verrattuna.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että glukoamylaasin (EC 3.2.1.3) annetaan vaikuttaa liuokseen yhdessä sakkaridinsiirtoentsyymin kanssa.

12. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon röntgendiffraktio-jauheanalyysillä määritetyt pääasialliset diffraktiokulmat (2θ) ovat: 10,3°, 14,8°, 16,2°, 18,4° ja 24,5°.

13. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiteytysvaihe suoritetaan kiteyttimen läsnä ollessa.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kideytimien määrä on 0,1 - 10 paino/paino-%.

15. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että liuoksen ylikyllästysaste on 1,05 - 1,5.

16. Menetelmä elintarvikkeen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että siinä yhtenä vaiheena sisällytetään kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa elintarvikkeeseen.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä t u n n e t t u siitä, että 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa sisältyy elintarvikkeeseen vähintään 0,01 paino/paino-%.

18. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa on valmistettu patenttivaatimuksen 3 mukaisella menetelmällä.

19. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihapon röntgendiffraktio-jauheanalyysillä määritetyt pääasialliset diffraktiokulmat (2θ) ovat: 10,3°, 14,8°, 16,2°, 18,4° ja 24,5°.

20. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa sisällytetään elintarvikkeeseen yhdessä E-vitamiinin ja/tai P-vitamiinin kanssa.

21. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa sisällytetään elintarvikkeeseen sellaisenaan tai liuoksena.

22. Menetelmä kosmeettisen tuotteen valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että tuotteeseen yhtenä vaiheena sisällytetään vaikuttavana aineosana kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo on valmistettu patenttivaatimuksen 3 mukaisella menetelmällä.

24. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiteisen 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihaponröntgendiffraktio-jauheanalyysillä määritetyt pääasialliset vallitsevat diffraktiokulmat (2θ) ovat: 10,3°, 14,8°, 16,2°, 18,4° ja 24,5°.

25. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappo sisällytetään tuotteeseen yhdessä E-vitamiinin ja/tai P-vitamiinin kanssa.

26. Patenttivaatimuksen 22 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kiteistä 2-O-α-D-glukopyranosyyli-L-askorbiinihappoa sisällytetään tuotteeseen sellaisenaan tai liuoksena.

Patentkrav

1. Kristallinsk 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyra.

2. Kristallinsk 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyra enligt patentkrav 1, vars med röntgendiffraktionspulveranalys bestämda huvudsakliga diffraktionvinklar (2θ) är 10,3°, 14,8°, 16,2°, 18,4° och 24,5°.

3. Förfarande för framställning av kristallinsk 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyra, k ä n n e t e c k n a t därav, att 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyra kristalliseras ur sin övermättade lösning och den erhållna kristallina 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyran tages tillvara.

4. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att den övermättade lösningen framställs genom att man låter sackaridtransferenzym som sådant eller tillsammans med glukoamylas inverka på en L-askorbinsyra och α-glukosylsackarid innehållande lösning, varvid bildas 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyra, och genom att taga tillvara och rena den erhållna 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyran.

5. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att nämnda sackaridtransferenzym är cyklomaltodextringlukanotransferas (EC 2.4.1.19) eller α-glukosidas.

6. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att α-glukosylsackariden väljs land följande: maltooligosackarid, partialhydrolysat av stärkelse, flytande stärkelse, gelatinerad stärkelse, löslig stärkelse och blandningar av dessa.

7. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att sackaridtransferenzym användes i en mängd, som åstadkommer en fullständig reaktion inom 3 - 80 timmar.

8. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att sackaridtransferenzymet får inverka på lösningen vid pH-värdet 3 - 9 och temperaturen 20 - 80 °C.

9. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att koncentrationen för L-askorbinsyran är minst 1 vikt/vikt-%.

10. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att koncentrationen för α-glukosylsackarid är 0,5 - 30-faldig jämfört med koncentrationen för L-askorbinsyra.

11. Förfarande enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att glukoamylas (EC 3.2.1.3) får inverka på lösningen tillsammans med sackaridtransferenzymet.

12. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att de för den kristallina 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyran med röntgendiffraktionspulveranalys bestämda huvudsakliga diffraktionvinklarna (2θ) är 10,3°, 14,8°, 16,2°, 18,4° och 24,5°.

13. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att kristallisationsskedet utförs i närvaro av en ympkristall.

14. Förfarande enligt patentkrav 13, k ä n n e t e c k n a t därav, att mängden ympkristaller är 0,1 - 10 vikt/vikt-%.

15. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att övermättnadsgraden hos lösningen är 1,05 - 1,5.

16. Förfarande för framställning av livsmedel, k ä n n e t e c k n a t därav, att därvid som ett skede inkorporeras kristallinsk 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyra i livsmedlet.

17. Förfarande enligt patentkrav 16, k ä n n e t e c k n a t därav, att minst 0,1 vikt/vikt-% 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyra ingår i livsmedlet.

18. Förfarande enligt patentkrav 16, k ä n n e t e c k n a t därav, att 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyran framställts enligt förfarandet enligt patentkrav 3.

19. Förfarande enligt patentkrav 16, k ä n n e t e c k n a t därav, att de för den kristallina 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyran med röntgendiffraktionspulveranalys bestämda huvudsakliga diffraktionvinklarna (2θ) är 10,3°, 14,8°, 16,2°, 18,4° och 24,5°.

20. Förfarande enligt patentkrav 16, k ä n n e t e c k n a t därav, att 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyra inkorporeras i livsmedlet tillsammans med E-vitamin och/eller P-vitamin.

21. Förfarande enligt patentkrav 16, k ä n n e t e c k n a t därav, att kristallin 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyra inkorporeras i livsmedlet som sådan eller som lösning.

22. Förfarande för framställning av en kosmeetisk produkt, k ä n n e t e c k n a t därav, att till produkten i ett skede som verksam beståndsdel inkorporeras kristallinsk 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyra.

23. Förfarande enligt patentkrav 22, k ä n n e t e c k n a t därav, att 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyran framställts enligt förfarandet enligt patentkrav 3.

24. Förfarande enligt patentkrav 22, k ä n n e t e c k n a t därav, att de för den kristallina 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyran med röntgendiffraktionspulveranalys bestämda huvudsakliga diffraktionvinklarna (2θ) är 10,3°, 14,8°, 16,2°, 18,4° och 24,5°.

25. Förfarande enligt patentkrav 22, k ä n n e t e c k n a t därav, att 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyra ingår i produkten tillsammans med E-vitamin och/eller P-vitamin.

26. Förfarande enligt patentkrav 22, k ä n n e t e c k n a t därav, att kristallin 2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbinsyra inkorporeras i produkten som sådan eller som lösning.

FIG.1

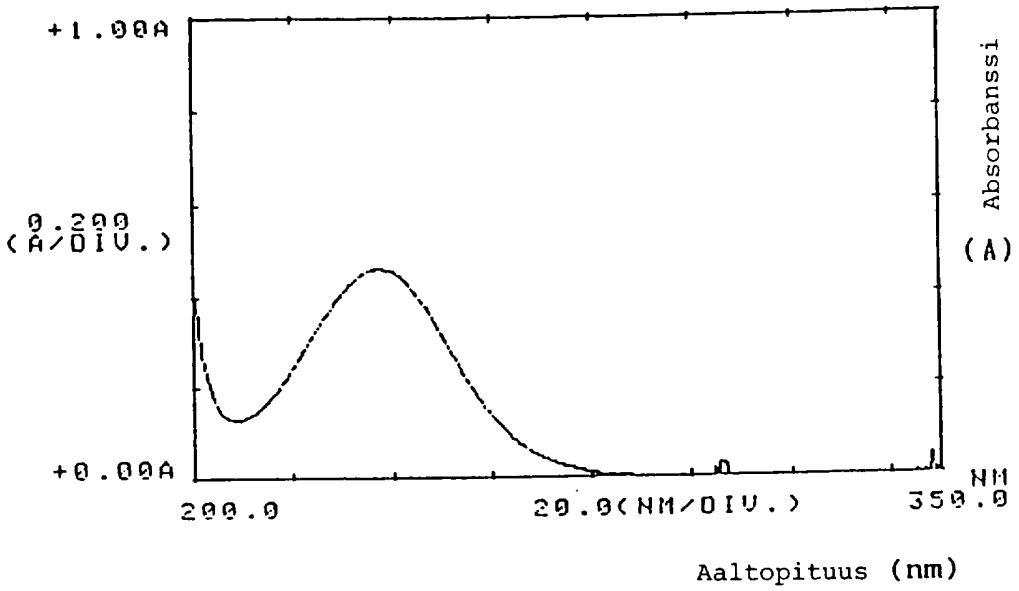

+1.00A
0.200
(A/DIV.)
+0.00A
Absorbanssi
(A)
200.0
20.0(NM/DIV.)
350.0
NM
Aaltopituus (nm)

FIG.2

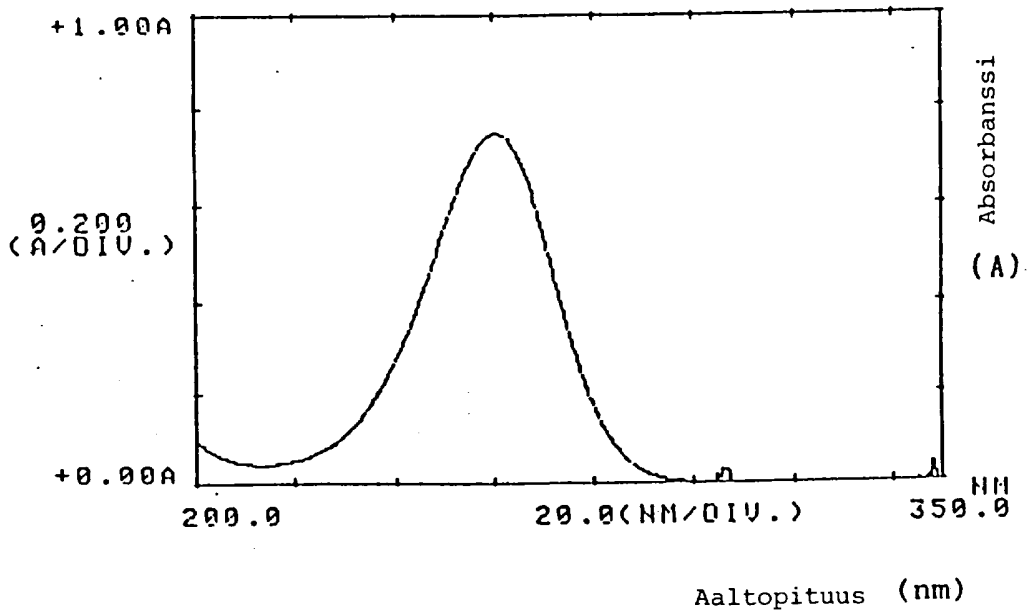
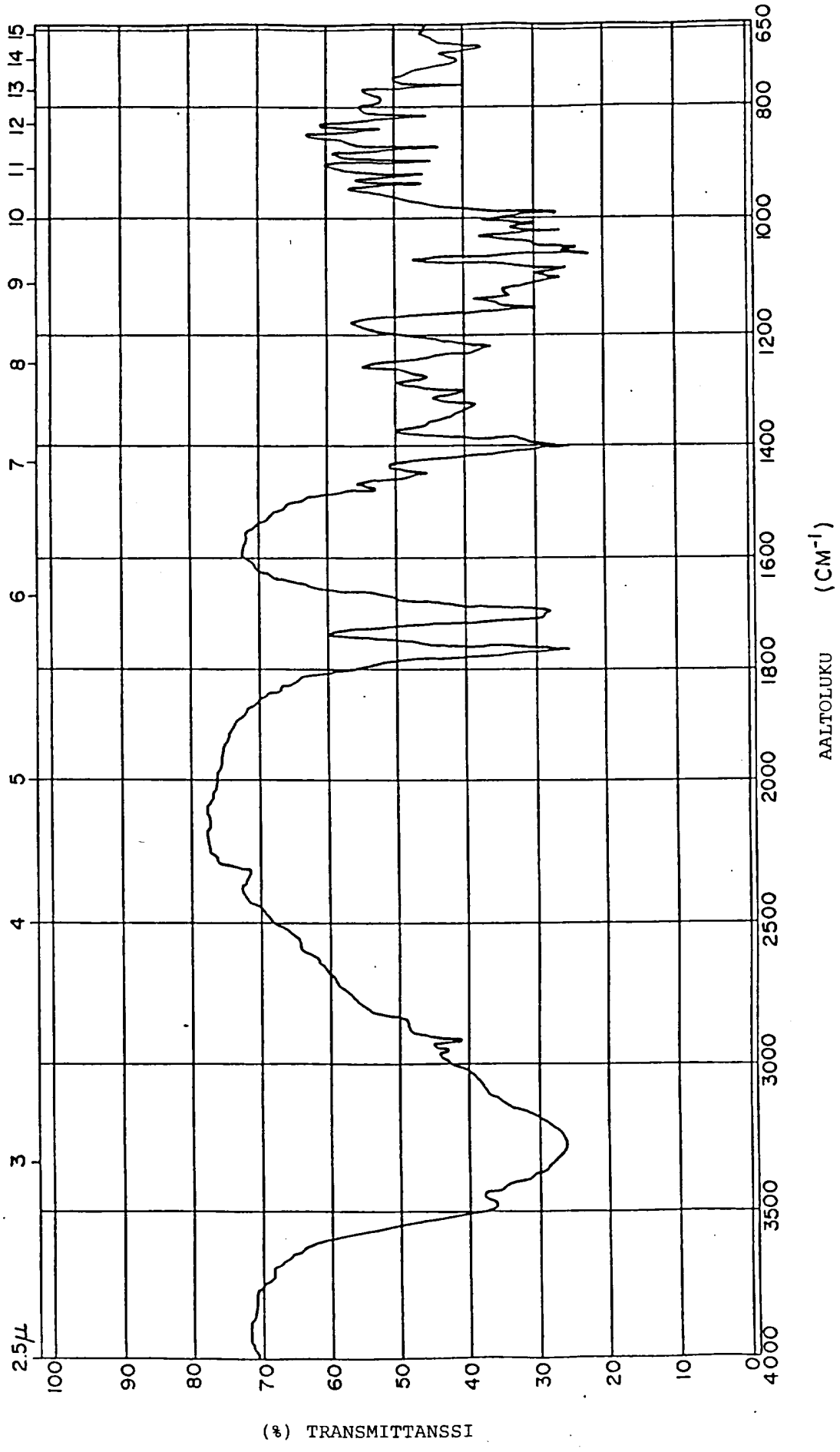

+1.00A
0.200
(A/DIV.)
+0.00A
Absorbanssi
(A)
200.0
20.0(NM/DIV.)
350.0
NM
Aaltopituus (nm)

FIG. 3


2.5μ
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
4000
3500
3000
2500
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
650
(%) TRANSMITTANSSI
AALTOLUKU (CM-1)

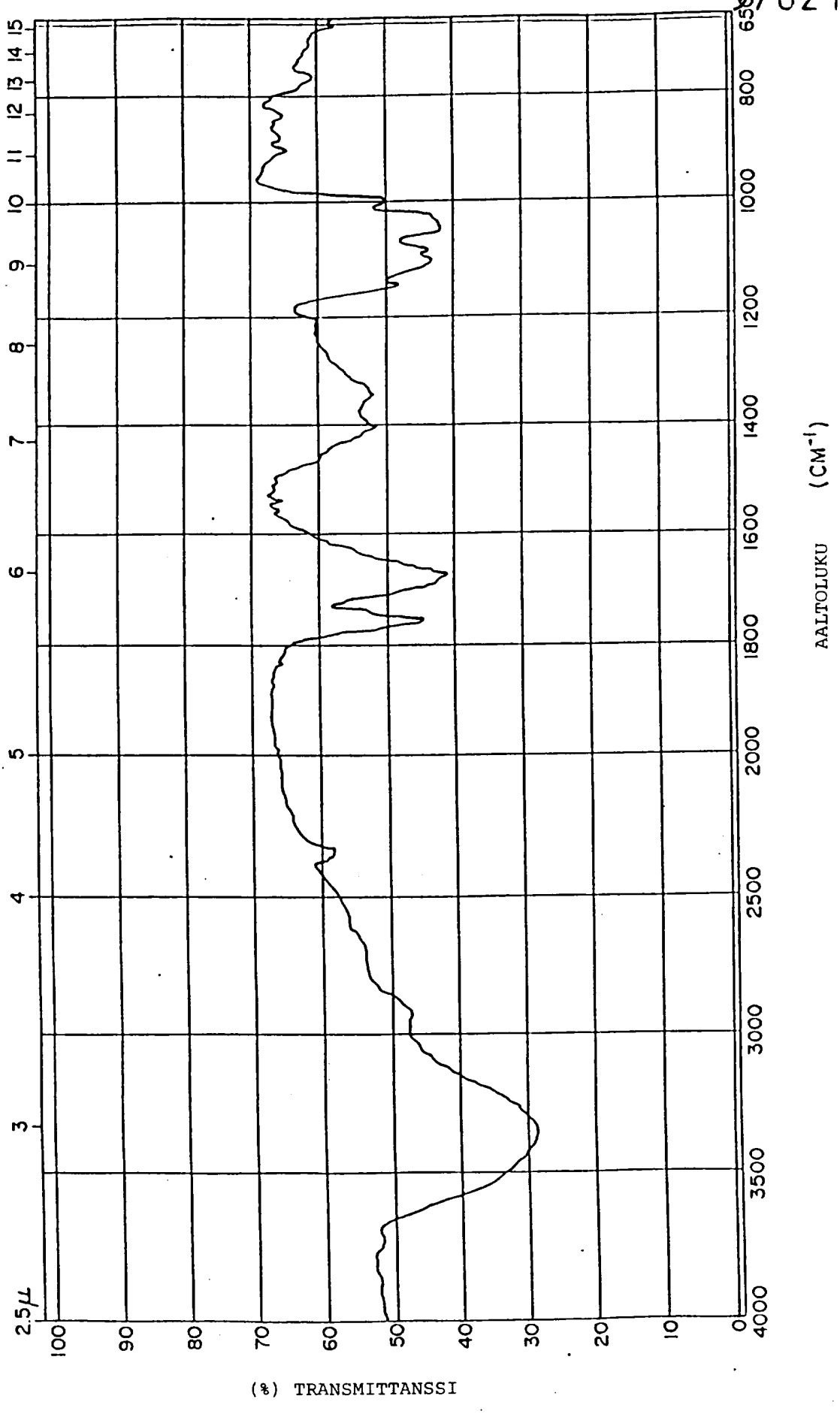

2.5μ
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
4000
3500
3000
2500
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
650
(%) TRANSMITTANSSI
AALTOLUKU (CM-1)

FIG. 4

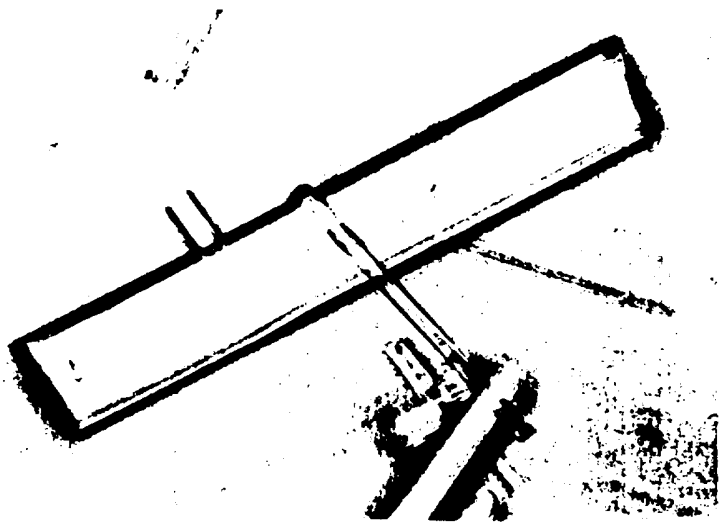


FIG.5

FIG.6

