



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0021007

(51)⁷ A23K 1/16, 1/18, C07C 319/20, C07D
241/08, C07C 319/28

(13) B

(21) 1-2011-01264

(22) 09.10.2009

(86) PCT/EP2009/063160 09.10.2009

(87) WO2010/043558 22.04.2010

(30) 10 2008 042 932.5 17.10.2008 DE

(45) 27.05.2019 374

(43) 26.12.2011 285

(73) EVONIK DEGUSSA GMBH (DE)

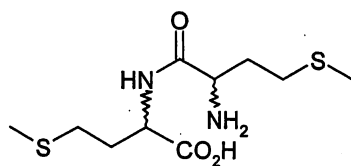
Rellinghauser StraBe 1-11, 45128 Essen, Germany

(72) KOBLER, Christoph (DE), HAUSSNER, Thomas (DE), WECKBECKER, Christoph (DE)

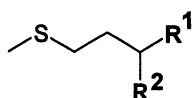
(74) Văn phòng luật sư Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT DL-METIONYL-DL-METIONIN LÀM CHẤT PHỤ GIA THỨC ĂN CHO CÁ VÀ ĐỘNG VẬT GIÁP XÁC

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất DL-metionyl-DL-metionin (I) có công thức (I) bằng cách chuyển hóa dẫn xuất urê có công thức chung (II) thành DL-metionyl-DL-metionin, trong đó các gốc R^1 và R^2 trong dẫn xuất ure IIa, IIb, IIc, IId, IId, IId và IIg được xác định như sau: IIa: $R^1 = \text{COOH}$, $R^2 = \text{NHCONH}_2$, IIb: $R^1 = \text{CONH}_2$, $R^2 = \text{NHCONH}_2$, IIc: $R^1 = \text{CONH}_2$, $R^2 = \text{NH}_2$, IId: $R^1\text{-}R^2 = \text{-CONHCONH-}$, IId: $R^1 = \text{CN}$, $R^2 = \text{OH}$, IId: $R^1 = \text{CN}$, $R^2 = \text{NH}_2$, IIg: $R^1 = \text{=O}$, $R^2 = \text{H}$. DL-metionyl-DL-metionin và các muối của nó có thể dùng làm chất phụ gia thức ăn trong hỗn hợp thức ăn cho động vật thủy sản nuôi.



(I)



(II)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến quy trình mới để tổng hợp metionylmetionin, dipeptit của metionin, và ứng dụng cụ thể của chúng làm chất phụ gia thức ăn ở dạng đơn lẻ hoặc trộn với metionin làm nguồn dinh dưỡng cho cá và động vật giáp xác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các axit amin thiết yếu (*essential amino acids* - EAA) như metionin, lysin hoặc threonin là các hợp phần rất quan trọng làm chất phụ gia thức ăn trong nguồn dinh dưỡng cấp cho động vật và đóng một vai trò quan trọng trong quá trình chăn nuôi thương mại các động vật lấy thịt, trứng hoặc sữa chẳng hạn như gà, lợn và động vật nhai lại. Việc bổ sung EAA vào nguồn protein tự nhiên như đậu nành, ngô và lúa mì một mặt có thể có tác dụng làm cho động vật tăng trưởng nhanh hơn, hoặc cho nhiều sữa hơn ở những con bò cho nhiều sữa, nhưng mặt khác còn làm cho việc sử dụng thức ăn hiệu quả hơn. Điều này mang lại lợi thế thương mại rất lớn. Thị trường của các chất phụ gia thức ăn đóng một vai trò lớn trong ngành công nghiệp và thương mại. Ngoài ra, việc sản xuất các chất này là một thị trường phát triển nhanh, đặc biệt là với các nước tăng trưởng nhanh, chẳng hạn như Trung Quốc và Ấn Độ.

L-metionin (axit (S)-2-amino-4-methylthiobutyric) là axit amin hạn chế được dùng đầu tiên cho nhiều loài động vật chẳng hạn như gà, vịt, gà tây và ngoài ra còn dùng cho nhiều loại cá và động vật vỏ giáp và do đó có một vai trò rất quan trọng trong nguồn dinh dưỡng cấp cho động vật và làm chất phụ gia thức ăn (Rosenberg và các đồng tác giả, J. Agr. Food Chem. 1957, 5, 694-700 và Lovell, T. R., J. Anim. Sci. 1991, 69, 4193-4200). Tuy nhiên, trong quá trình tổng hợp hóa học thông thường, metionin được tạo ra dưới dạng raxemat, là hỗn hợp 50:50 của D- và L-metionin. Tuy nhiên, DL-metionin ở dạng raxemic này có thể được sử dụng trực tiếp làm chất phụ gia thức ăn vì ở một số loài trong điều kiện *in vivo* có cơ chế chuyển đổi chuyển hóa chất đồng phân đối ảnh D metionin không có trong tự nhiên thành chất đồng phân đối

ảnh L tự nhiên. Quá trình này đòi hỏi rằng trước hết D-metionin được khử amin thành α -ketometionin nhờ D-oxidaza không đặc hiệu, và sau đó được chuyển hóa tiếp thành L-metionin nhờ L-transaminaza (Baker, D.H. in “Amino acids in farm animal nutrition”, D’Mello, J.P.F. (ed.), Wallingford (UK), CAB International, 1994, 37-61). Lượng L-metionin có mặt trong cơ thể được tăng lên nhờ đó và khi đó có thể có tác dụng đến sự phát triển của động vật. Đã nhận thấy có sự chuyển hóa từ D-metionin thành L-metionin nhờ enzym ở gà, lợn và bò, nhưng đặc biệt là còn ở các loài cá ăn thịt và ăn tạp và còn ở tôm và tôm he. Do vậy, ví dụ, Sveier và các đồng tác giả (Aquacult. Nutr. 2001, 7 (3), 169-181) và Kim và các đồng tác giả (Aquaculture 1992, 101 (1-2), 95-103) đã chỉ ra rằng có thể có quá trình chuyển hóa D-metionin thành L-metionin trong loài cá hồi Đại Tây Dương ăn thịt và cá hồi vân. Robinson và các đồng tác giả (J. Nutr. 1978, 108 (12), 1932-1936) và Schwarz và các đồng tác giả (Nghề nuôi trồng thủy sản 1998, 161, 121-129) cũng đã chứng tỏ được rằng cũng xảy ra quá trình trên với các loài cá ăn tạp chẳng hạn như cá trê và cá chép. Ngoài ra, Forster và Dominy (J. World Aquacult. Soc. 2006, 37 (4), 474-480) trong thử nghiệm cấp thức ăn cho tôm ăn tạp thuộc loài *Litopenaeus vannamei* đã cho thấy rằng DL-metionin có hoạt tính giống như L-metionin.

Năm 2007 sản lượng trên toàn thế giới của DL-metionin ở dạng tinh thể và chất tương tự metionin hydroxy lỏng racemic (metionin hydroxy analog - MHA, axit rac-2-hydroxy-4-(metylthio)butanoic (HMB)) và MHA canxi rắn là nhiều hơn 700 000 tấn, được sử dụng trực tiếp thành công làm chất phụ gia thức ăn cho động vật một khoang bụng chẳng hạn như gia cầm và lợn. Do việc chăn nuôi cá và động vật giáp xác trong nuôi trồng thủy sản quy mô công nghiệp cao phát triển thương mại nhanh chóng, trong những năm gần đây việc lựa chọn nguồn cung cấp metionin một cách hiệu quả và kinh tế đã trở nên càng quan trọng chính trong lĩnh vực này (Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO) Fisheries Department “State of World Aquaculture 2006”, 2006, Rome, International Food Policy Research Institute (IFPRI) “Fish 2020: Supply and Demand in Changing Markets”, 2003, Washington, D.C.). Tuy nhiên, khác với gà và lợn, đã nảy sinh các vấn đề khác nhau khi sử dụng metionin, MHA hoặc Ca-MHA làm chất phụ gia thức ăn cho một số loài cá và động vật giáp xác. Do vậy, Rumsey và Ketola (J. Fish. Res. Bd. Can. 1975, 32,

422-426) đã cho thấy rằng việc sử dụng đồ ăn từ đậu nành kết hợp với axit amin ở dạng tinh thể được bổ sung đơn lẻ không làm tăng tác dụng tăng trưởng bất kỳ cho cá hồi vân. Murai và các đồng tác giả (Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 1984, 50, (11), 1957) đã chỉ ra rằng việc cung cấp hàng ngày thức ăn cho cá với tỷ lệ cao axit amin bổ sung dạng tinh thể cao làm hơn 40% axit amin tự do trong cá chép bị thoát ra qua mang và thận. Vì có sự hấp thu nhanh chóng axit amin được bổ sung vào sau khi dùng thức ăn, nên có sự gia tăng rất nhanh nồng độ axit amin này trong huyết tương máu cá (đáp ứng nhanh). Tuy nhiên, vào thời điểm này, các axit amin khác trong nguồn protein tự nhiên chẳng hạn như đồ ăn từ đậu nành vẫn chưa có mặt trong huyết tương, nên có thể dẫn đến sự có mặt không đồng thời của tất cả các axit amin quan trọng. Kết quả của hiện tượng này là một phần axit amin có nồng độ cao được bài tiết ra nhanh chóng hoặc tham gia vào quá trình trao đổi chất trong cơ thể một cách nhanh chóng, và được sử dụng ví dụ như là nguồn năng lượng tinh khiết. Do đó, chỉ đạt được mức tăng trưởng thấp hoặc không có sự tăng trưởng, khi sử dụng axit amin ở dạng tinh thể làm chất phụ gia thức ăn (Aoe và các đồng tác giả, Bull. Jap. Carp Soc. Sci. Fish. 1970, 36, 407-413). Việc bổ sung axit amin ở dạng tinh thể có thể dẫn đến các vấn đề khác nữa ở động vật giáp xác. Tập tính ăn từ từ của một số động vật giáp xác chẳng hạn như tôm thuộc loài *Litopenaeus Vannamei*, và do thức ăn lưu lại trong nước trong thời gian dài, làm cho axit amin tan trong nước được bổ sung vào bị hoà tan (ngâm chiết), cung cấp nguồn dinh dưỡng tốt cho nước chứ không làm tăng sự tăng trưởng của động vật (Alam và các đồng tác giả, Aquaculture 2005, 248, 13-16).

Do đó, đối với một số loài và ứng dụng nhất định, để cung cấp hiệu quả thức ăn cho cá và động vật giáp xác là động vật thủy sản nuôi, cần có dạng sản phẩm metionin đặc biệt, chẳng hạn như metionin được bảo vệ bằng phương pháp hoá học hoặc vật lý thích hợp. Mục đích của việc này là một mặt sản phẩm vẫn giữ đủ ổn định trong môi trường nước trong quá trình cho ăn và không bị hoà tan ra khỏi thức ăn. Mặt khác, sản phẩm metionin mà thực tế được động vật ăn vào có thể được sử dụng một cách tối ưu và với hiệu quả cao trong cơ thể động vật.

Trước đây, đã có nhiều nỗ lực phát triển chất phụ gia thức ăn thích hợp, đặc biệt là chất phụ gia trên cơ sở metionin, cho cá và động vật giáp xác. Do vậy, ví dụ,

WO 8906497 đề cập đến việc sử dụng di- và tripeptit làm chất phụ gia thức ăn cho cá và động vật giáp xác. Mục đích của việc sử dụng là thúc đẩy sự tăng trưởng của động vật. Tuy nhiên, các di- và tripeptit được ưu tiên sử dụng trong trường hợp này là các axit amin không thiết yếu và do đó còn là axit amin không hạn chế chẳng hạn như glyxin, alanin và serin. Dipeptit chỉ chứa metionin được mô tả là DL-alanyl-DL-metionin và DL-metionyl-DL-glyxin. Tuy nhiên, điều này có nghĩa là về mặt hiệu quả chỉ 50% hoạt chất (mol/mol) có mặt trong dipeptit này, và điều này phải được nhận biết là rất bất lợi xét trên khía cạnh kinh tế. WO 02088667 đề xuất phương pháp tổng hợp chọn lọc đối ảnh và sử dụng oligome của MHA và axit amin chẳng hạn như metionin làm chất phụ gia thức ăn, ngoài ra là các chất khác, cũng dùng cho cá và động vật giáp xác. Trong tài liệu này đã nêu rằng nhờ đó có thể đạt được sự tăng trưởng nhanh hơn. Các oligome được mô tả được lắp ghép bằng phản ứng được xúc tác bằng enzym và thể hiện phân bố chiều dài mạch oligome đơn lẻ rất rộng. Điều này làm cho quy trình sản xuất và tinh chế trở nên không có tính chọn lọc, chi phí cao và phức tạp. Trong US 20030099689, Dabrowski và các đồng tác giả đề xuất việc sử dụng peptit tổng hợp làm chất phụ gia thức ăn để thúc đẩy sự tăng trưởng của động vật thủy sinh. Trong trường hợp này, tỷ lệ của peptit trong chế phẩm thức ăn đầy đủ có thể lên đến 6-50% theo khối lượng. Tốt hơn nếu peptit tổng hợp này bao gồm các axit amin thiết yếu và không hạn chế. Tuy nhiên, quá trình tổng hợp oligo- và polypeptit được tổng hợp như vậy là rất phức tạp, chi phí cao và khó chuyển thành sản xuất ở quy mô công nghiệp. Ngoài ra, hiệu quả của các polypeptit chứa một loại axit amin vẫn là vấn đề nghi ngờ, bởi vì các polypeptit này thường được chuyển hóa rất chậm hoặc hoàn toàn không chuyển hóa thành axit amin tự do trong điều kiện sinh lý. Do vậy, ví dụ, Baker và các đồng tác giả (J. Nutr. 1982, 112, 1130-1132) cho thấy poly-L-metionin không có giá trị sinh lý trong gà vì nó hoàn toàn không tan trong nước, nên không thể hấp thu được trong cơ thể.

Bên cạnh việc sử dụng dẫn xuất metionin hóa học mới chẳng hạn như các peptit và oligome chứa metionin, cũng đã có khảo sát về các dạng bảo vệ vật lý khác nhau, chẳng hạn như các lớp bao và kết hợp axit amin trong chất mang bảo vệ. Do vậy, ví dụ như, Alam và các đồng tác giả (Aquacult. Nutr. 2004, 10, 309-316 và Aquaculture 2005, 248, 13-19) đã cho thấy là khác với dạng không được bao, metionin

và lysin được bao có ảnh hưởng rất tốt đến sự tăng trưởng của tôm Nhật bản bé. Mặc dù việc sử dụng lớp bao đặc biệt có thể hạn chế sự ngấm chiết của metionin và lysin ra khỏi dạng viên thức ăn, phương pháp này có một số nhược điểm quan trọng. Quy trình điều chế hoặc bao bọc metionin thường là phức tạp về mặt kỹ thuật và tỉ mỉ và do đó chi phí cao. Ngoài ra, sau khi bao, bề mặt bao của metionin dễ bị phá hủy bởi ứng suất cơ học và mài mòn trong quá trình chế biến thức ăn, có thể làm giảm hoặc làm mất hoàn toàn lớp bảo vệ vật lý. Thêm một yếu tố nữa là hàm lượng của metionin giảm đi, và do đó thường là việc tạo lớp bao hoặc sử dụng chất nền là không kinh tế.

Ngoài ứng dụng mới sáng tạo sử dụng DL-metionyl-DL-metionin làm chất phụ gia thức ăn có đặc tính chiết chậm từ viên nhỏ và viên đùn thức ăn, và sự cung cấp tối ưu metionin vào cơ thể thông qua sự phân cắt giải phóng từ từ metionylmetionin, các tác giả sáng chế này đã phát triển được quy trình mới để sản xuất metionylmetionin có nhiều ưu điểm so với các dạng quy trình điều chế như đã biết. Phần lớn các phương pháp tổng hợp dipeptit đã được bộc lộ trong tài liệu sử dụng các nhóm bảo vệ đất tiên chẳng hạn như các nhóm bảo vệ Boc-(*tert*-butoxycarbonyl) hoặc Z-(benzyloxycarbonyl), các nhóm này được đính vào axit amin thích hợp trước khi tiến hành tổng hợp dipeptit cần điều chế, và sau đó được loại ra. Ngoài ra, thông thường cần phải hoạt hóa axit amin sẽ được liên hợp. Do vậy, có thể điều chế metionylmetionin bằng cách thực hiện phản ứng liên hợp N-Boc-metionin với este methyl của metionin bằng cách sử dụng đixyclohexylcarbodiimide (DCC). Nhược điểm lớn của quá trình điều chế này là việc phải sử dụng các nhóm bảo vệ đất tiên, quy trình tổng hợp rất phức tạp và tác nhân liên hợp chi phí cao mà không thể tái sử dụng chẳng hạn như DCC. Một phương pháp khác dùng để tổng hợp metionylmetionin ở quy mô công nghiệp được mô tả trong DE 2261926. 3,6-bis[2-methylthio)etyl]-2,5-piperazindion (metionindiketopiperazin, DKP) được tạo thành trong giai đoạn đầu tiên bằng cách gia nhiệt este isopropyl của metionin và sau đó được thủy phân thành metionylmetionin. Trong trường hợp này, trong bước thủy phân chỉ có thể đạt được hiệu suất ở mức vừa phải khoảng 62-65%. Ngoài ra, việc sử dụng metionin isopropyl este làm nguyên liệu đòi hỏi chi phí cao và do đó không kinh tế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích chung của sáng chế là đề xuất thức ăn cho động vật hoặc chất phụ gia thức ăn dùng trong nguồn dinh dưỡng cấp cho động vật trên cơ sở chất thay thế metionin mới có thể sử dụng ở dạng đơn lẻ hoặc dưới dạng hỗn hợp với metionin, đặc biệt là trong lĩnh vực nuôi trồng cá và động vật giáp xác ở quy mô công nghiệp. Đồng thời, cần phát triển được quy trình tổng hợp chất thay thế metionin này một cách đơn giản và hiệu quả về chi phí.

Để khắc phục các nhược điểm nêu trên, mục đích cụ thể của sáng chế là tạo ra sản phẩm metionin được bảo vệ hoá học để nuôi các loài cá và động vật giáp xác ăn tạp, ăn cỏ và ăn thịt khác nhau sống trong nước mặn hoặc nước ngọt. Đặc biệt, sản phẩm này cần có đặc tính hòa tan thấp (ngâm chiết) của viên nhỏ thức ăn hoặc viên đùn hoàn toàn trong nước và cơ chế giải phóng chậm, tức là giải phóng từ từ và liên tục metionin tự do trong điều kiện sinh lý. Ngoài ra, cũng dự tính rằng sản phẩm metionin mới có thể sử dụng tốt hơn ở dạng hỗn hợp với DL-metionin.

Một đối tượng nữa là tìm ra được chất thay thế metionin làm thức ăn cho động vật hoặc chất phụ gia thức ăn có giá trị sinh học rất cao và được dự tính là dễ xử lý và bảo quản và có độ ổn định tốt ở điều kiện bình thường chế biến thức ăn chứa hợp chất này, đặc biệt là quá trình tạo viên nhỏ và quá trình đùn.

Bằng cách này có thể cung cấp cho cá và động vật giáp xác nguồn metionin hiệu quả khác nữa, ngoài DL-metionin dạng tinh thể, nguồn này nếu có nhược điểm thì chỉ có nhược điểm ở mức độ giảm đi so với các sản phẩm đã biết hoặc không có nhược điểm.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp tổng hợp metionylmetionin (DL-metionyl-DL-metionin) mới linh hoạt trong đó các tiền chất và các sản phẩm phụ thông thường trong quá trình sản xuất DL-metionin công nghiệp có thể được sử dụng làm nguyên liệu. Ngoài ra, còn dự định phát triển quy trình thích hợp để phân tách cặp chất đồng phân không đối quang DD/LL- và DL/LD-metionylmetionin, sao cho có thể

sử dụng chỉ một cặp chất đồng phân không đối quang (DL/LL-I hoặc DL/LD-I) một cách tối ưu và hiệu quả cho các ứng dụng cụ thể.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là đồ thị thể hiện sự phân cắt bằng enzym các hỗn hợp chất đồng phân không đối quang metionylmetionin DD/LL-I, DL/LD-I và DD/LL/DL/LD-I.

Fig. 2 là đồ thị thể hiện sự phân cắt bằng enzym bốn chất đồng phân không đối quang metionylmetionin DD-I, LL-I, DL-I và LD-I với mức độ phân cắt khác nhau.

Fig. 3 là đồ thị thể hiện sự giải phóng metionin (D- cùng với L-Met) bằng enzym từ bốn chất đồng phân không đối quang metionylmetionin DD-I, LL-I, DL-I và LD-I.

Fig. 4 thể hiện sự chuyển hóa sinh học D-metionin thành L-metionin bằng hỗn hợp enzym từ cá chép Nhật.

Fig. 5 thể hiện các đặc tính ngấm chiết của các hỗn hợp chất đồng phân không đối quang metionylmetionin DD/LL-I, DL/LD-I và LL/DD/LD/DL-I so với metionin, MHA và MHA-Ca.

Fig. 6 thể hiện sự phân cắt *in vitro* của bốn chất đồng phân không đối quang metionylmetionin khác nhau LL-I, LD-I, DL-I và DD-I bằng enzym tiêu hóa của cá chép Nhật.

Fig. 7 thể hiện sự phân cắt *in vitro* của hỗn hợp chất đồng phân không đối quang metionylmetionin khác nhau LL/DD-I, DL/LD-I và LL/DD/LD/DL-I bằng enzym tiêu hóa của cá chép Nhật.

Fig. 8 thể hiện sự phân cắt *in vitro* của bốn chất đồng phân không đối quang metionylmetionin khác nhau LL-I, LD-I, DL-I và DD-I bằng enzym tiêu hóa của cá hồi vân.

Fig. 9 thể hiện sự phân cắt *in vitro* của các hỗn hợp chất đồng phân không đối quang metionylmetionin LL/DD-I, DL/LD-I và LL/DD/LD/DL-I bằng enzym tiêu hóa của cá hồi vân.

Fig. 10 thể hiện sự phân cắt *in vitro* của bốn chất đồng phân không đối quang metionylmetionin khác nhau LL-I, LD-I, DL-I và DD-I bằng enzym tiêu hóa của tôm thẻ chân trắng.

Fig. 11 thể hiện sự phân cắt *in vitro* của các hỗn hợp chất đồng phân không đối quang metionylmetionin khác nhau LL/DD-I, DL/LD-I và LL/DD/LD/DL-I bằng enzym tiêu hóa của tôm thẻ chân trắng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Đạt được mục đích này các tác giả sáng chế sử dụng DL-metionyl-DL-metionin và muối của nó làm chất phụ gia thức ăn trong hỗn hợp thức ăn cho động vật thủy sản nuôi.

Theo một phương án được ưu tiên, hỗn hợp thức ăn này chứa DL-metionyl-DL-metionin với lượng từ 0,01 đến 5% theo khối lượng, và tốt hơn nếu chứa từ 0,05 đến 0,5% theo khối lượng.

Việc sử dụng DL-metionyl-DL-metionin tỏ ra là đặc biệt tiện lợi trong ứng dụng này vì hợp chất này có đặc tính ngậm chiết tốt do hỗn hợp DD/LL/DL/LD-metionylmetionin và cặp chất đồng phân không đối quang DL/LD-metionylmetionin (0,4 g/l) có độ tan thấp.

Hợp chất này còn có độ ổn định trong quá trình tạo viên nhỏ và quá trình đùn trong sản xuất thức ăn. DL-metionyl-DL-metionin cũng có tính ổn định trong hỗn hợp với các thành phần và thức ăn cho động vật thông thường chẳng hạn như ngũ cốc (ví dụ, ngô, lúa mì, cây cây triticale (là cây ngũ cốc lai giữa lúa mì và lúa mạch đen), lúa mạch, cây kê, ngoài ra là các cây khác), các nguồn protein thực vật hoặc động vật (ví dụ, đậu nành và hạt cây cải dầu và sản phẩm chế biến của chúng, quả đậu (ví dụ, đậu Hà lan, đậu, đậu lupin, v.v.), đồ ăn từ cá, ngoài ra là các đồ ăn khác) và ở dạng kết hợp

với nguồn axit amin bổ sung thiết yếu như protein, peptit, hydratcacbon, vitamin, chất khoáng, chất béo và dầu.

Còn có một ưu điểm nữa là, tiết kiệm được một mol nước cho mỗi mol metionylmetionin so với DL-metionin nhờ có hàm lượng hoạt chất metionylmetionin cao cho mỗi kg chất.

Trong một ứng dụng được ưu tiên, hỗn hợp thức ăn này chứa protein và hydratcacbon, tốt hơn nếu là các chất trên cơ sở đồ ăn từ cá, đồ ăn từ đậu nành hoặc đồ ăn từ ngô, và có thể được bổ sung axit amin thiết yếu, protein, peptit, vitamin, chất khoáng, hydratcacbon, chất béo và dầu.

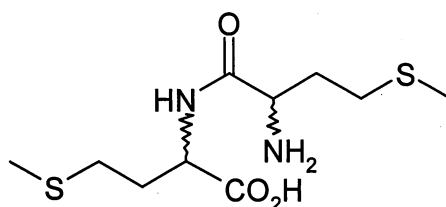
Được ưu tiên đặc biệt là DL-metionyl-DL-metionin có mặt trong hỗn hợp thức ăn chỉ dưới dạng hỗn hợp DD/LL/LD/DL, dưới dạng hỗn hợp DL/LD hoặc DD/LL, tốt hơn nếu trong mỗi trường hợp còn được trộn thêm với DL-metionin, tốt hơn nếu hàm lượng DL-metionin là từ 0,01 đến 20% theo khối lượng, đặc biệt tốt hơn nếu từ 1 đến 10% theo khối lượng.

Trong một ứng dụng được ưu tiên đặc biệt, DL-metionyl-DL-metionin có mặt dưới dạng cặp chất đồng phân đối ảnh DL/LD-metionylmetionin.

Trong một ứng dụng được ưu tiên, động vật thủy sản nuôi là cá và động vật giáp xác nước ngọt và nước mặn được chọn từ nhóm gồm cá chép, cá hồi, cá hồi (nước mặn), cá trê, cá rô, cá bơn, cá tầm, cá ngừ, cá chình, cá vền, cá tuyết, tôm, loài nhuyễn thể mà cá voi ăn được và tôm he, tốt hơn nữa nếu là cá mè trắng Hoa Nam (*Hypophthalmichthys molitrix*), cá trắm cỏ (*Ctenopharyngodon idella*), cá chép Nhật (*Cyprinus carpio*) và cá mè hoa (*Aristichthys nobilis*), cá giếc (*Carassius carassius*), cá catla (*Catla Catla*), cá Rohu (*Labeo rohita*), cá hồi Thái Bình Dương và cá hồi Đại Tây Dương (*Salmon salar* và *Oncorhynchus kisutch*), cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*), cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*), cá trê Phi (*Clarias gariepinus*), cá tra (*Pangasius bocourti* và *Pangasius hypophthalmus*), cá rô phi sông Nin (*Oreochromis niloticus*), cá măng sữa (*Chanos*), cá giò (*Rachycentron canadum*), tôm thẻ chân trắng

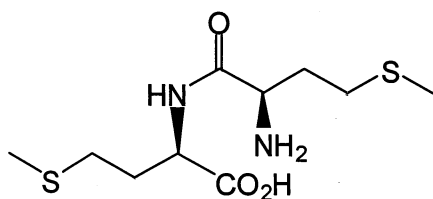
(*Litopenaeus vannamei*), tôm sú (*Penaeus monodon*) và tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*).

Theo sáng chế, DL-metionyl-DL-metionin (I) (metionylmetionin hoặc viết tắt là Met-Met) hoặc muối kim loại kiềm và kim loại kiềm thổ của nó chẳng hạn như muối canxi hoặc muối kẽm có độ tan thấp được sử dụng để bổ sung vào hỗn hợp thức ăn dưới dạng hỗn hợp chất đồng phân không đối quang DD/LL/DL/LD, DD/LL hoặc DL/LD, hoặc ở dạng đơn lẻ hoặc phối trộn với DL-metionin, tốt hơn nếu dùng cho cá và động vật giáp xác:

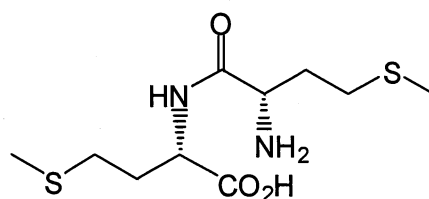


(I)

Có bốn chất đồng phân lập thể khác nhau (chất đồng phân không đối quang) cho dipeptit DL-metionyl-DL-metionin (I), là DD-, LL, DL- và LD-I, trong đó chỉ có dạng L-metionyl-L-metionin (LL-I) là có trong tự nhiên, tất cả ba dipeptit khác L-metionyl-D-metionin (LD-I), D-metionyl-L-metionin (DL-I) và D-metionyl-D-metionin (DD-I) không có trong tự nhiên (tham khảo sơ đồ 1).



(DD-I) (LL-I)



(DL-I) (LD-I)

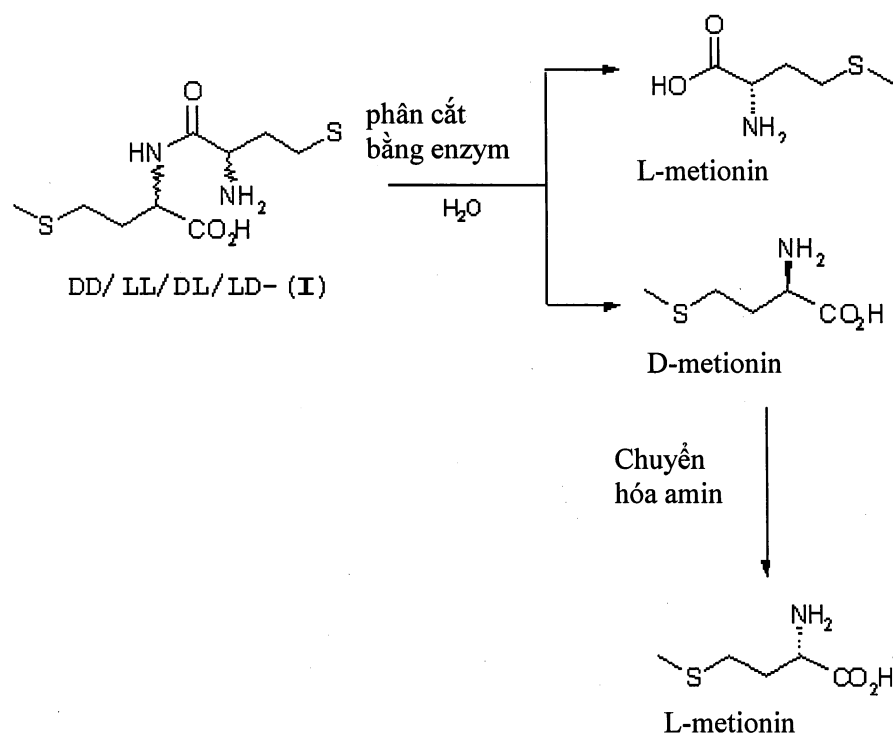
Sơ đồ 1

Tiếp theo, DD-I và LL-I có liên hệ với nhau như là hình ảnh và ảnh qua gương của nhau, tức là các chất này là các chất đồng phân đối ảnh và do đó, có tính chất vật lý giống nhau. Với cặp DL-I và LD-I cũng giống như vậy.

Ngược lại, hai cặp DD/LL-I và DL/LD-I là các chất đồng phân không đối quang của nhau, tức là chúng có số liệu vật lý khác nhau. Do vậy, ví dụ, cặp chất đồng phân không đối quang DD/LL-I có độ tan là 21,0 g/l trong nước ở nhiệt độ trong phòng, trong khi đó độ tan của cặp chất đồng phân không đối quang DL/LD-I là 0,4 g/l.

Ngoài việc phát triển các phương pháp mới tổng hợp metionylmetionin, sáng chế đề cập đến việc sử dụng DL-metionyl-DL-metionin làm thức ăn cho động vật dưới dạng hỗn hợp chất đồng phân không đối quang DD/LL/DL/LD, DD/LL hoặc DL/LD như là chất tăng trưởng cho cá và động vật giáp xác ăn tạp, ăn thịt và ăn cỏ trong nghề nuôi trồng thủy sản. Do đó, có thể chứng tỏ phát hiện sáng tạo rằng DL-metionyl-DL-metionin (I) có thể bị phân cắt trong điều kiện sinh lý bằng enzym của cá và động vật giáp xác thành D- và L-metionin tự do (sơ đồ 2) (ngoài ra tham khảo ví dụ 22 đến 24).

Với mục đích này, các enzym tiêu hóa tương ứng đã được phân tách từ cá chép (loài ăn tạp), cá hồi (loài ăn thịt) và tôm thẻ chân trắng (loài ăn tạp) và được cho phản ứng với DL-metionyl-DL-metionin trong thử nghiệm *in vitro* được tối ưu hóa trong điều kiện sinh lý tương đương. Một đặc điểm đặc biệt theo sáng chế của quá trình phân cắt DL-metionyl-DL-metionin (I) đó là có thể phân cắt tất cả bốn chất đồng phân không đối quang có thể có, cả đồng phân LL-I có trong tự nhiên, và ba chất đồng phân không đối quang không có trong tự nhiên DD-, DL- và LD-I trong điều kiện sinh lý. Điều này cũng đúng với cả việc sử dụng hỗn hợp đầy đủ của tất cả các chất đồng phân không đối quang (DD/LL/DL/LD-I), và trong mỗi trường hợp đến hai cặp chất đồng phân không đối quang DD/LL-I và DL/LD-I (tham khảo Fig. 1).



Sơ đồ 2

Tuy nhiên, sự phân cắt của các chất đồng phân không đối quang đơn lẻ của metionylmetionin xảy ra với tốc độ khác nhau. Điều này được thể hiện qua trình bày trên sơ đồ của sự phân cắt bằng enzym của từng chất đồng phân không đối quang của metionylmetionin bằng enzym tiêu hóa của cá và động vật giáp xác trên Fig. 2. Tuy nhiên, sự phân cắt chậm có nghĩa là sự giải phóng D- và L-metionin cũng bị chậm lại (tham khảo Fig. 3). Điều này có một ưu điểm lớn là có thể không có sự hấp thu đáp

ứng nhanh của D- hoặc L-metionin tự do trong dải tiêu hóa và do đó cũng không có đỉnh nồng độ của metionin tự do trong huyết tương.

Do đó, một ưu điểm của việc sử dụng metionylmetionin làm chất phụ gia thức ăn và nguồn metionin đó là D- hoặc L-metionin có thể được giải phóng ra trong cơ thể trong suốt thời gian tiêu hóa và do đó xảy ra đồng thời với quá trình giải phóng các axit amin khác từ nguồn protein tự nhiên (cơ chế giải phóng chậm) (tham khảo Fig. 3). Tác động đặc biệt này tạo ra và đảm bảo sự có mặt đồng thời của tất cả các axit amin quan trọng và thiết yếu với tỷ lệ lý tưởng trong huyết tương, khi điều này là rất cần thiết cho sự phát triển tối ưu của cơ thể.

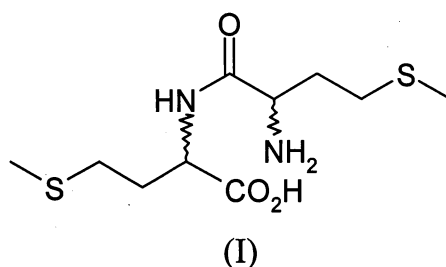
Trong quá trình phân cắt DL-metionyl-DL-metionin dipeptit (I) bằng enzym, D-metionin không có trong tự nhiên cũng được giải phóng ra ngoài L-metionin có trong tự nhiên (tham khảo sơ đồ 2). Chất sau này có thể được chuyển hóa amin bằng enzym ở cả cá và động vật giáp xác nước mặn và nước ngọt ăn thịt, ăn tạp và ăn cỏ để tạo ra L-metionin có trong tự nhiên. Có thể chứng tỏ điều này trong ví dụ của cá chép ở ví dụ 25. Nhờ hỗn hợp enzym gồm enzym tiêu hóa và enzym gan từ cá chép để chuyển hóa D- thành L-metionin trong điều kiện sinh lý tương ứng (tham khảo Fig. 4). Do đó, bảo đảm được nguồn cung tối ưu L-metionin tự nhiên cho cơ thể khi sử dụng DL-metionyl-DL-metionin (I).

Các thử nghiệm tạo viên nhỏ và đùn đùn các hỗn hợp khác nhau của DL-metionyl-DL-metionin (I) và các nguồn protein và hydrat cacbon tự nhiên chẳng hạn như đồ ăn từ cá, ngô và đậu nành, và trộn với axit amin thiết yếu, protein, peptit, vitamin, chất khoáng, chất béo và dầu, cho thấy là DL-metionyl-DL-metionin (I) là ổn định tuyệt đối trong và sau quá trình sản xuất và không có sự giảm chất lượng hoặc sự phân huỷ bất cứ nào xảy ra (tham khảo ví dụ 26).

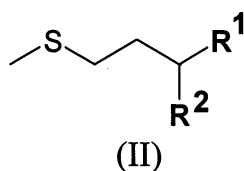
Để khảo sát đặc tính ngâm chiết của chất đồng phân không đối quang của metionylmetionin (I) từ viên nhỏ thức ăn chứa hợp chất trong nước, đo sự phụ thuộc của sự hoà tan metionylmetionin theo thời gian (tham khảo ví dụ 26). Để so sánh, các đặc tính ngâm chiết của DL-metionin, MHA và canxi-MHA (MHA-Ca) được khảo sát trong điều kiện như nhau. Điều rút ra được thí nghiệm này là cả hỗn hợp đầy đủ của tất

cả các chất đồng phân không đối quang (DD/LL/DL/LD-I) và cặp các chất đồng phân không đối quang DD/LL-I và DL/LD-I thể hiện rõ ràng sự ngậm chiết ít hơn DL-metionin, MHA và canxi-MHA (MHA-Ca) (tham khảo Fig. 5). Do đó lượng ít hơn nhiều metionylmetionin được hoà tan ra khỏi viên nhỏ thức ăn theo thời gian so với tất cả dẫn xuất metionin khác. Mức ngậm chiết đặc biệt thấp được thể hiện ở cặp chất đồng phân không đối quang DL/LD-I, nhiều nhất chỉ khoảng 5% của chất này được hoà tan ra khỏi viên nhỏ thức ăn thậm chí sau thời gian lưu 200 phút (tham khảo Fig. 5).

Mục đích đặt được tiếp theo là quy trình điều chế DL-metionyl-DL-metionin (I) có công thức

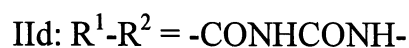
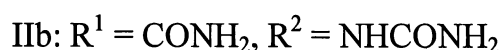


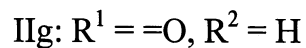
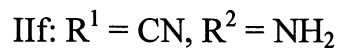
bằng cách cho phản ứng dẫn xuất ure có công thức chung II



trong đó các gốc R^1 và R^2 trong dẫn xuất ure IIa, IIb, IIc, IId, IId, IIe, IIe và IIg được xác định như sau:

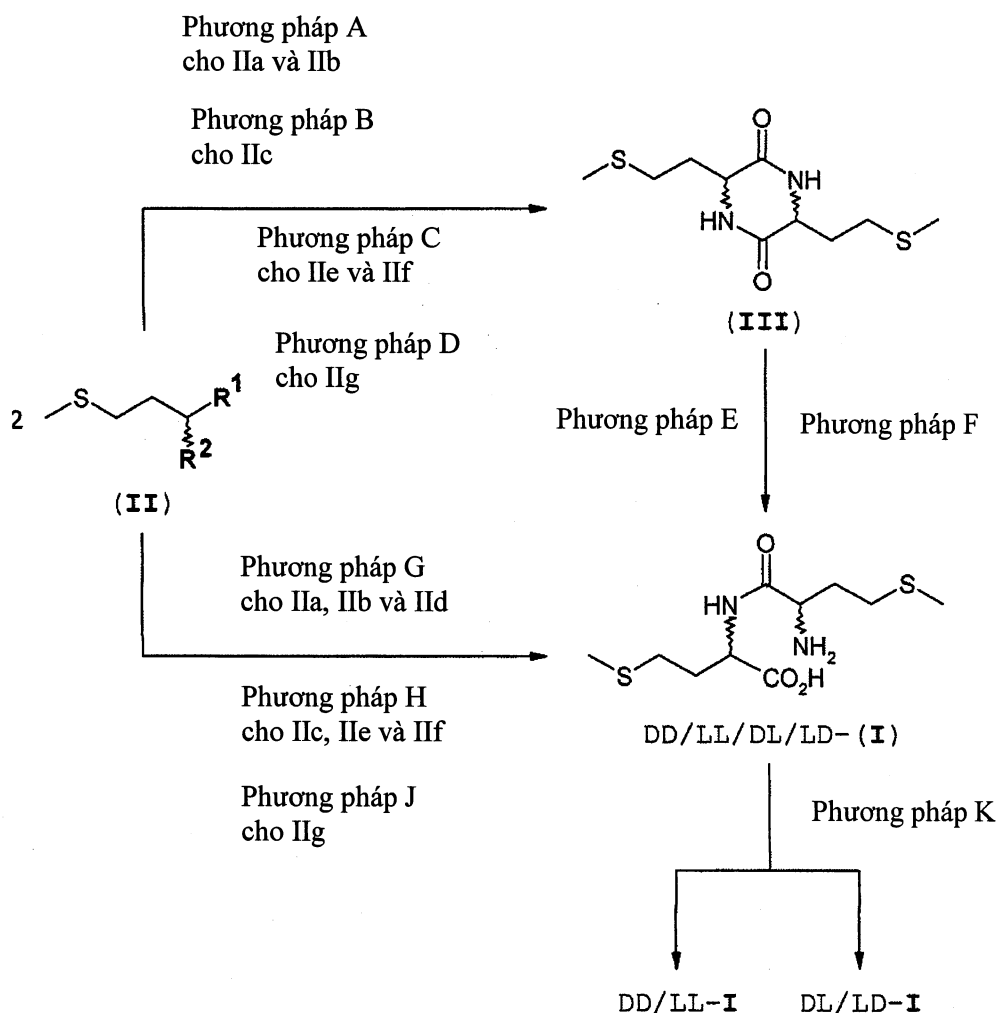
trong đó





để tạo ra DL-metionyl-DL-metionin (I).

Theo một phương án của quy trình theo sáng chế được ưu tiên hơn nữa là metioninhydantoin (II d) được sử dụng làm nguyên liệu hoặc được tạo ra như sản phẩm trung gian. Trong quy trình này, DL-metionyl-DL-metionin được tổng hợp trực tiếp từ metioninhydantoin và bao gồm các phương pháp G, H, và J được thể hiện trong Sơ đồ 3.



Sơ đồ 3

Về phản ứng này, ưu tiên là dung dịch chứa metioninhydantoin và nước được cho phản ứng với metionin trong điều kiện kiềm. Được ưu tiên hơn nữa là độ pH của dung dịch chứa dẫn xuất ure được điều chỉnh đến từ 8 đến 14, tốt hơn nếu từ 10 đến 13.

Theo một phương án được ưu tiên, phản ứng này xảy ra ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 200°C, tốt hơn nếu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 170°C và đặc biệt tốt hơn nếu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 130 đến 160°C.

Được ưu tiên hơn nữa là phản ứng được thực hiện ở điều kiện áp suất, tốt hơn nếu ở áp suất từ 3 đến 20 bar (300 kPa đến 2000 kPa), đặc biệt tốt hơn nếu ở áp suất từ 6 đến 15 bar (600 kPa đến 1500 kPa).

Theo một quy trình được ưu tiên hơn, dung dịch chứa metioninhydantoin và nước đã được tạo ra từ trước từ một hoặc nhiều hợp chất IIa, IIb, IIc, IId, IId, IId, IId và IIg.

Theo một quy trình được ưu tiên hơn, metioninhydantoin được thu nhận bằng cách cho hợp chất có công thức IIe hoặc IIf phản ứng với bazơ chứa nitơ, NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, hỗn hợp $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CO}_2$ hoặc các muối carbamat.

Tốt hơn nếu thực hiện phản ứng của hợp chất IIe ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 150°C, tốt hơn nếu từ 0°C đến 100°C và đặc biệt tốt hơn nếu từ 10°C đến 70°C.

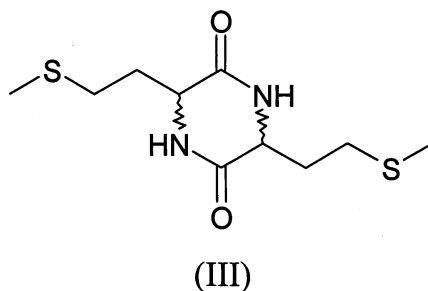
Theo một quy trình được ưu tiên hơn, thu nhận metioninhydantoin bằng cách cho hợp chất IIf phản ứng với CO_2 . Trong phản ứng này, ưu tiên là phản ứng này xảy ra với sự có mặt của bazơ, tốt hơn nếu chọn từ nhóm gồm KHCO_3 , K_2CO_3 , amin bậc ba hoặc muối của nó, bazơ của kim loại kiềm và kim loại kiềm thổ.

Theo một quy trình được ưu tiên hơn, thu nhận metioninhydantoin bằng cách cho hợp chất IIg phản ứng với nguồn ion xyanua và bazơ chọn từ nhóm gồm các bazơ chứa nitơ, các muối amoni với sự có mặt của CO_2 , NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, hỗn hợp $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CO}_2$ và các muối carbamat. Trong trường hợp này, phản ứng này xảy ra ở

nhệt độ tốt hơn là từ -20°C đến 150°C , tốt hơn nếu từ -10°C đến 100°C và đặc biệt tốt hơn nếu từ 0°C đến 70°C .

Một phương án khác của quy trình theo sáng chế bao gồm các bước sau đây:

a) cho dẫn xuất ure có công thức IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIf và IIg phản ứng để tạo ra diketopiperazin có công thức



b) phản ứng của diketopiperazin để tạo ra DL-metionyl-DL-metionin. Quy trình này bao gồm các phương pháp A, B, C và D được thể hiện trong Sơ đồ 3. Trong quy trình này, diketopiperazin (III) được tạo ra như là chất trung gian.

Về khía cạnh này được ưu tiên là phản ứng của dẫn xuất ure để tạo ra diketopiperazin được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 200°C , tốt hơn nếu ở nhiệt độ từ 100°C đến 180°C và đặc biệt tốt hơn nếu từ 140°C đến 170°C .

Theo một quy trình được ưu tiên, phản ứng của dẫn xuất ure để tạo ra diketopiperazin xảy ra ở điều kiện áp suất, tốt hơn nếu ở áp suất từ 3 đến 20 bar (300 kPa đến 2000 kPa), đặc biệt tốt hơn nếu ở áp suất từ 6 đến 15 bar (600 kPa đến 1500 kPa).

Tốt hơn, nếu phản ứng của dẫn xuất ure để tạo ra diketopiperazin xảy ra với sự có mặt của bazơ. Về khía cạnh này, tốt hơn nếu bazơ này được chọn từ nhóm gồm các bazơ chứa nitơ, NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, KHCO_3 , K_2CO_3 , hỗn hợp $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CO}_2$, muối carbamat, bazơ của kim loại kiềm và kim loại kiềm thổ.

Theo một quy trình được ưu tiên hơn, phản ứng của dẫn xuất ure để tạo ra diketopiperazin xảy ra bằng cách cho phản ứng với metionin. Về khía cạnh này, tỷ số của dẫn xuất ure so với metionin từ 1:100 đến 1:0,5 là được ưu tiên.

Theo một quy trình được ưu tiên hơn, phản ứng của diketopiperazin để tạo ra DL-metionyl-DL-metionin xảy ra bằng cách thủy phân bằng axit. Trong trường hợp này, thủy phân bằng axit được thực hiện với sự có mặt của axit tốt hơn nếu được chọn từ nhóm gồm các axit vô cơ, HCl, H_2CO_3 , $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , axit phosphoric, axit carboxylic và axit hydroxy carboxylic.

Theo một phương án khác của quy trình theo sáng chế, phản ứng của diketopiperazin để tạo ra DL-metionyl-DL-metionin xảy ra bằng cách thủy phân bằng kiềm. Trong trường hợp này, để thu được DL-metionyl-DL-metionin, tốt hơn nếu phản ứng thủy phân bằng kiềm này được thực hiện ở độ pH từ 7 đến 14, đặc biệt tốt hơn nếu ở độ pH từ 9 đến 12, đặc biệt tốt hơn nữa nếu ở độ pH từ 10 đến 11. Hơn nữa, có thể điều chỉnh điều kiện kiềm bằng cách sử dụng một chất tốt hơn nếu được chọn từ nhóm gồm các bazơ chứa nitơ, NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, hỗn hợp $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CO}_2$, các muối carbamat, KHCO_3 , K_2CO_3 , cacbonat, bazơ của kim loại kiềm và kim loại kiềm thổ.

Tốt hơn, nếu quá trình thủy phân bằng axit hoặc kiềm được thực hiện ở nhiệt độ từ 50°C đến 200°C , tốt hơn nếu từ 80°C đến 180°C và đặc biệt tốt hơn nếu từ 90°C đến 160°C .

Theo một phương án khác, phản ứng của diketopiperazin để tạo ra DL-metionyl-DL-metionin được thực hiện bằng cách đưa CO_2 vào dung dịch kiềm, tốt hơn nếu vào dung dịch hydroxit amoni, kali hydroxit hoặc natri hydroxit có tính kiềm.

Theo một quy trình được ưu tiên, diketopiperazin được tách ra trước khi thủy phân. Về khía cạnh này, tốt hơn nếu diketopiperazin được tách ra khỏi dung dịch phản ứng này bằng cách kết tinh, tốt hơn nếu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -30 đến 120°C , đặc biệt tốt hơn nếu ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 70°C .

Để phân tách hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang DD/LL/DL/LD-metionylmetionin ra khỏi dung dịch phản ứng kiềm, dung dịch này được axit hoá và thu nhận metionylmetionin bằng cách kết tinh hoặc kết tủa. Về khía cạnh này tốt hơn nếu độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 9, được ưu tiên đặc biệt là độ pH từ 5 đến 7, và được ưu tiên rất đặc biệt là độ pH vào khoảng 5,6. Về khía cạnh này, có thể sử dụng

axit, tốt hơn nếu được chọn từ nhóm gồm các axit vô cơ, HCl, H_2CO_3 , $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , axit phosphoric, axit carboxylic và axit hydroxy carboxylic để axit hóa.

Để phân tách hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang DD/LL/DL/LD-metionylmetionin ra khỏi dung dịch phản ứng có tính axit, cho thêm bazơ để trung hòa, và thu nhận metionylmetionin bằng cách kết tinh hoặc kết tủa. Về khía cạnh này, tốt hơn nếu độ pH từ 5 to 9, được ưu tiên đặc biệt là độ pH từ 5 đến 7, và được ưu tiên rất đặc biệt là độ pH vào khoảng 5,6. Trong trường hợp này, tốt hơn nếu các bazơ được sử dụng để trung hòa được chọn từ nhóm gồm NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, bazơ chứa nito, NH_4OH , muối carbamat, KHCO_3 , K_2CO_3 , cacbonat, bazơ của kim loại kiềm và kim loại kiềm thổ.

Sáng chế còn đề xuất quy trình tách chiết hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang DD/LL/DL/LD-metionylmetionin bằng cách kết tinh phân đoạn, do đó thu được hai cặp chất đồng phân đối ảnh DD/LL-metionylmetionin và DL/LD-metionylmetionin.

Theo một phương án được ưu tiên của quy trình kết tinh phân đoạn bằng axit hóa, quy trình là như sau:

a) axit hóa huyền phù chứa DD/LL/DL/LD-metionylmetionin cho đến khi thu được dung dịch trong, và bổ sung từng bước bazơ vào dung dịch có tính axit này cho đến khi chất kết tủa tách ra, tạo ra DL/LD-metionylmetionin dưới dạng chất kết tủa,

b) thu nhận DD/LL-metionylmetionin từ nước cái thu được ở bước a).

Về khía cạnh này, được ưu tiên đặc biệt là quá trình axit hóa ở bước a) xảy ra bằng cách dùng axit và thiết lập độ pH từ 0,1 đến 1,0, tốt hơn nếu ở độ pH vào khoảng 0,6, và sau đó điều chỉnh dung dịch trong thu được bằng bazơ đến độ pH từ 5 đến 6, tốt hơn nếu đến độ pH vào khoảng 5,6. Về khía cạnh này có thể sử dụng các axit vô cơ, tốt hơn nếu là axit phosphoric, axit sulfuric, axit clohydric hoặc axit cacbonic, hoặc cacbon đioxit, và/hoặc các axit carboxylic, đặc biệt là các axit carboxylic $\text{C}_1\text{-C}_4$, axit formic, axit axetic, axit propionic, axit butyric hoặc axit isobutyric làm axit. Axit

cacbonic hoặc cacbon đioxit được đặc biệt ưu tiên sử dụng. Trong trường hợp này có thể đưa axit cacbonic hoặc cacbon đioxit vào hỗn hợp phản ứng ở điều kiện áp suất khí quyển áp suất hoặc ở áp suất cao hơn áp suất khí quyển.

Điều kiện kiềm được điều chỉnh ở bước a) tốt hơn nếu bằng cách sử dụng bazơ chọn từ nhóm gồm NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, các bazơ chứa nitơ, NH_4OH , các muối carbamat, KHCO_3 , K_2CO_3 , cacbonat, các bazơ kim loại kiềm và các bazơ kim loại kiềm thổ.

Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa của quy trình kết tinh phân đoạn bằng phương pháp kiềm hóa, quy trình là như sau:

a) kiềm hóa huyền phù chứa DD/LL/DL/LD-metionylmetionin cho đến khi thu được dung dịch trong, và bổ sung từng bước axit này vào dung dịch kiềm cho đến khi chất kết tủa tách ra và tạo ra DL/LD-metionylmetionin dưới dạng chất kết tủa.

b) sau đó thu được DD/LL-metionylmetionin từ nước cái thu được ở bước a).

Về khía cạnh này, được ưu tiên đặc biệt là quá trình kiềm hóa ở bước a) diễn ra nhờ bazơ và điều chỉnh độ pH từ 7,5 đến 14, tốt hơn nếu đến độ pH vào khoảng 9 đến 13, và sau đó điều chỉnh dung dịch trong thu được bằng axit đến độ pH từ 5 đến 6, tốt hơn nếu đến pH vào khoảng 5,6. Tốt hơn nếu các bazơ được sử dụng trong trường hợp này là các bazơ được chọn từ nhóm NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, các bazơ chứa nitơ, NH_4OH , các muối carbamat, KHCO_3 , K_2CO_3 , cacbonat, bazơ của kim loại kiềm và kim loại kiềm thổ.

Tốt hơn nếu điều kiện axit ở bước a) được điều chỉnh bằng cách sử dụng axit được chọn từ nhóm gồm các axit vô cơ, tốt hơn nếu là axit phosphoric, axit sulfuric, axit clohydric, hoặc axit cacbonic hoặc cacbon đioxit, và/hoặc từ nhóm các axit carboxylic, đặc biệt là các axit carboxylic $\text{C}_1\text{-C}_4$, axit formic, axit axetic, axit propionic, axit butyric và axit isobutyric. Axit cacbonic hoặc cacbon đioxit được ưu tiên đặc biệt để sử dụng.

Theo một phương án được ưu tiên của quy trình kết tinh phân đoạn, quy trình này xảy ra ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 100°C, tốt hơn nếu từ 5°C đến 60°C và đặc biệt tốt hơn nếu từ 10°C đến 40°C.

Ngoài ra, DD/LL-metionylmetionin thu được có thể được raxemic hóa và được cho tham gia vào quy trình tách như đã nêu trên, do đó tách được hai cặp chất đồng phân đối ảnh DD/LL-metionylmetionin và DL/LD-metionylmetionin ra khỏi nhau.

Tốt hơn nếu, tất cả các quy trình theo sáng chế đã được đề cập được thực hiện trong môi trường nước.

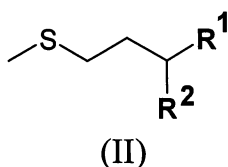
Ngoài ra, các quy trình theo sáng chế có thể được thực hiện theo quy trình gián đoạn đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực hoặc theo quy trình liên tục.

Ví dụ thực hiện sáng chế

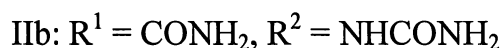
A) Tổng quan của các bước riêng lẻ và các phương pháp của quy trình theo sáng chế

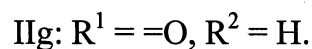
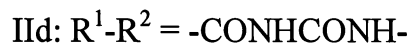
Quy trình theo sáng chế dùng để điều chế DL-metionyl-DL-metionin (I) và việc tách thành cặp chất đồng phân không đối quang DD/LL-I và DL/LD-I được mô tả chi tiết sau đây.

Quy trình theo sáng chế để điều chế DL-metionyl-DL-metionin (I) bắt đầu từ hợp chất có công thức chung II

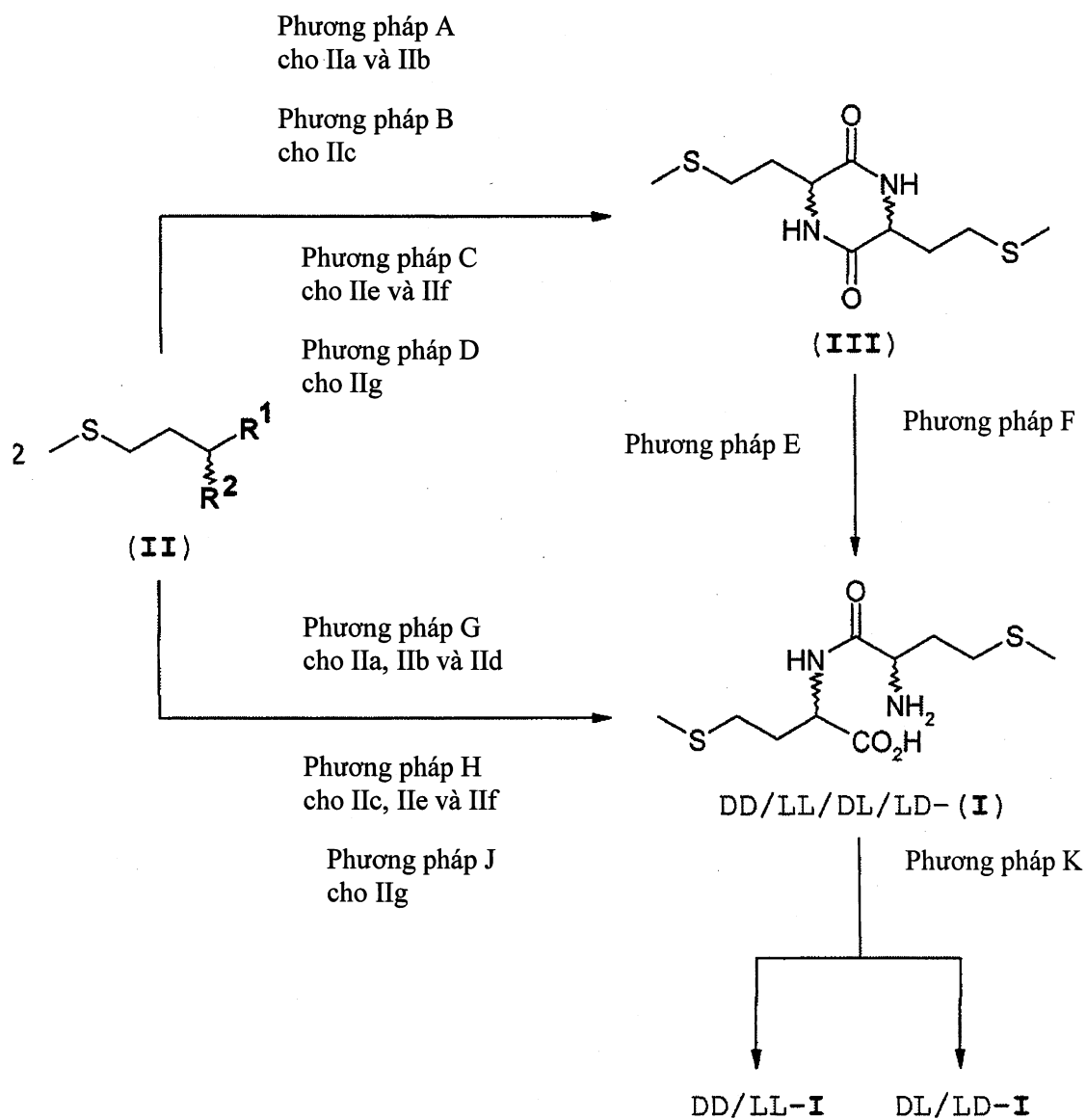


trong đó





Hợp chất này được chuyển hóa bằng các phương pháp tổng hợp khác nhau (A, B, C, D, E, F, G, H và J) thành DL-metionyl-DL-metionin (I) (tham khảo sơ đồ 3). Trong các phương pháp A, B, C, và D trong đó, diketopiperazin (III) tương ứng được tạo ra dưới dạng chất trung gian. Trong các phương pháp tổng hợp G, H và J, metionin hydantoin được tạo ra tạo ra dưới dạng chất trung gian và được chuyển hóa trực tiếp thành DL-metionyl-DL-metionin (I). Sau đó, bằng cách kết tinh phân đoạn theo phương pháp K có thể tách riêng hai cặp chất đồng phân không đối quang DD/LL-I và DL/LD-I (tham khảo sơ đồ 3).



Sơ đồ 3

B) Các ví dụ tổng hợp:

Ví dụ 1:

Tổng hợp 3,6-bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III)
(metionindiketopiperazin, DKP) từ N-carbamoylmethionin (IIa) theo phương pháp A

Hoà tan 17,5 g (90,0 mmol, độ tinh khiết: 99%) N-carbamoylmethionin (IIa) trong 150 ml nước và khuấy trong nồi hấp tự động Roth dung tích 200 ml bằng máy khuấy từ ở nhiệt độ 160°C trong thời gian 6 giờ. Áp suất trong quá trình này. Thỉnh thoảng, lại xả khí một lần cho đến khi đạt được áp suất là 7 bar (700 kPa). Sau khi hoàn thành phản ứng này, làm nguội nồi hấp tự động trong bể nước đá. Sau đó lọc huyền phù thu được, và rửa vài lần chất rắn lọc được bằng nước và làm khô trong lò sấy ở nhiệt độ 50°C trong chân không. Hiệu suất tách là 8,1 g (30,9 mmol) (69%) bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III), tinh thể màu trắng hơi vàng, độ tinh khiết > 98% (HPLC), nhiệt độ nóng chảy 234-236°C.

¹H-NMR 3,6-bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III) (500 MHz, D₆-DMSO): δ = 1,85-2,05 (m, 4H, 2 x SCH₂CH₂); 2,049 (s, 6H, 2 x SCH₃); 2,46-2,60 (m, 4H, 2 x SCH₂); 3,92-3,99 (m, 2H, 2 x CH); 8,213 (s, 2H, 2 x NH)

¹³C-NMR của 3,6-bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III) (125,8 MHz, D₆-DMSO): δ = 14,35 (CH₃); 14,38 (CH₃); 28,50 (CH₂S); 28,68 (CH₂S); 31,92 (CH₂CH₂S); 32,33 (CH₂CH₂S); 52,92 (CH); 52,96 (CH); 167,69 (C=O); 167,71 (C=O)

Phân tích nguyên tố cho C₁₀H₁₈N₂O₂S₂ (M = 262,39 g/mol):

Theo tính toán: C 45,77; H 6,91; N 10,68; S 24,44

Theo thực nghiệm: C 45,94; H 6,96; N 10,64; S 24,38

Ví dụ 2:

Tổng hợp 3,6-bis[2-(metylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III) (metionindiketopiperazin, DKP) từ 2-[(aminocarbonyl)amino]-4-(metylthio)butanoamit (N-carbamoylmetioninamit) (IIb) theo phương pháp A

Hoà tan 17,4 g (90,0 mmol, độ tinh khiết: 98,5%) 2-[(aminocarbonyl)amino]-4-(metylthio)butanoamit (IIb) trong 150 ml nước và khuấy trong nồi hấp tự động Roth dung tích 200 ml bằng máy khuấy từ ở nhiệt độ 160°C trong thời gian 7 giờ. Áp suất tăng lên trong quá trình này. Thỉnh thoảng, lại xả khí một lần cho đến khi đạt đến áp suất là 7 bar (700 kPa). Sau khi hoàn thành phản ứng này, làm nguội nồi hấp tự động trong bể nước đá. Sau đó, lọc huyền phù thu được, và rửa vài lần chất rắn lọc được bằng nước và làm khô trong lò sấy ở nhiệt độ 50°C trong chân không. Hiệu suất tách là 9,2 g (35,1 mmol) (78%) bis[2-(metylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III), tinh thể màu trắng hơi vàng, độ tinh khiết > 98% (HPLC).

Các số liệu về nhiệt độ nóng chảy và NMR phù hợp với các kết quả của ví dụ 1.

Ví dụ 3:

Tổng hợp 3,6-bis[2-(metylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III) (metionindiketopiperazin, DKP) từ 5-[2-(metylthio)etyl]-2,4-imidazolidindion (IIc) (metioninhydantoin) theo phương pháp A và sau đó tái sử dụng nước cái (phản ứng bậc)

Mê đầu tiên:

Cho huyền phù chứa 13,4 g (0,09 mol) metionin, 17,2 g (0,09 mol, độ tinh khiết: 91%) metioninhydantoin (IIc) và 150 g nước vào nồi hấp tự động Roth dung tích 200 ml bằng máy khuấy từ và khuấy ở nhiệt độ 160°C trong thời gian 6 giờ, trong thời gian đó áp suất tăng lên đến 15 bar (1500 kPa). Thỉnh thoảng, nồi hấp tự động được xả áp cho đến khi áp suất giữ ở mức không đổi 10 bar (1000 kPa). Sau đó làm lạnh nồi hấp tự động trong bể nước đá, và lọc huyền phù thu được và rửa chất rắn này

bằng 75 ml nước. Cuối cùng, làm khô chất rắn này trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Phân tách được bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III) dưới dạng tinh thể màu trắng hơi vàng.

Các mẻ tiếp theo:

Nước rửa và nước cái từ mẻ trước được trộn lại và cô đặc còn 90 ml trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở nhiệt độ 50°C. 17,2 g (0,09 mol, độ tinh khiết: 91%) metioninhydantoin (IIId) được kết hợp với nước cái cô đặc và được pha với nước đến 150 g dung dịch. Đưa dung dịch thu được vào nồi hấp tự động Roth dung tích 200 ml có máy khuấy từ và khuấy ở nhiệt độ 160°C trong thời gian 6 giờ, trong thời gian đó áp suất tăng lên đến 15 bar (1500 kPa). Thỉnh thoảng, nồi hấp tự động được xả nén cho đến khi áp suất giữ ở mức không đổi là 10 bar (1000 kPa). Bước hoàn thiện tiếp theo được tiến hành tương tự với mẻ đầu tiên.

Ví dụ 4:

Tổng hợp 3,6-bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III) (metionindiketopiperazin, DKP) từ 2-amino-4-(methylthio)butanoamit (metioninamit) (IIc) theo phương pháp B

Hoà tan 16,6 g (0,09 mol) 2-amino-4-(methylthio)butanoamit hydroclorua (IIc) và 8,7 g (0,09 mol) $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ trong 150 g nước và khuấy trong nồi hấp tự động Roth dung tích 200 ml bằng cách khuấy từ ở nhiệt độ 160°C trong thời gian 6 giờ. Sau đó nồi hấp tự động được làm lạnh trong bể nước đá. Tiếp theo, lọc huyền phù thu được, và rửa vài lần chất rắn lọc được với nước và làm khô trong lò sấy ở nhiệt độ 50°C trong chân không. Hiệu suất tách là 6,5 g (24,8 mmol) (55%) bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III), tinh thể màu trắng hơi vàng, độ tinh khiết > 98% (HPLC).

Các số liệu về nhiệt độ nóng chảy và NMR phù hợp với các kết quả từ ví dụ 1.

Ví dụ 5:

Tổng hợp 3,6-bis[2-(methylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III) (metionindiketopiperazin, DKP) từ 2-hydroxy-4-(methylthio)butannitril (3-(methylmercapto)propionalđehyt xyanohydrin, MMP-CH) (IIe) theo phương pháp C

Bổ sung từ từ từng giọt dung dịch 30,5 g (0,232 mol) 2-hydroxy-4-(methylthio)butannitril (IIe) và 360 g nước ở nhiệt độ trong phòng vào huyền phù chứa 22,4 g (0,283 mol = 1,22 đương lượng) NH_4HCO_3 trong 20 g nước và khuấy trong thời gian 2 h. NH_4HCO_3 được hoà tan trong thời gian này. Sau đó khuấy dung dịch thu được ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 7 h và tiếp theo ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Sau đó chuyển hỗn hợp phản ứng này vào nồi hấp tự động bằng thép dung tích 500 ml, gia nhiệt đến nhiệt độ 160°C , và khuấy ở nhiệt độ này trong thời gian 6 giờ. Sau đó nồi hấp tự động được làm lạnh trong bể nước đá, lọc huyền phù thu được, và rửa chất rắn bằng 50 ml nước. Cuối cùng, làm khô chất rắn màu xám trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hiệu suất tách là 17,8 g (67,8 mmol) (58%) bis[2-(methylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III), tinh thể màu trắng hơi vàng, độ tinh khiết > 98% (HPLC).

Các số liệu về nhiệt độ nóng chảy và NMR phù hợp với các kết quả từ ví dụ 1.

Ví dụ 6:

Tổng hợp 3,6-bis[2-(methylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III) (metionindiketopiperazin, DKP) từ 2-amino-4-(methylthio)butannitril (metioninnitril) (IIIf) theo phương pháp C

Chuyển dòng trung bình CO_2 vào dung dịch chứa 26,2 g (0,201 mol) 2-amino-4-(methylthio)butannitril (IIIf) trong 330 g nước trong thời gian 3 giờ, trong thời gian đó nhiệt độ tăng lên đến 45°C và độ pH được giữ ở mức 8. Sau đó khuấy tiếp tục ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Sáng hôm sau, chuyển hỗn hợp phản ứng này vào nồi hấp tự động bằng thép dung tích 500 ml, được gia nhiệt đến 160°C và khuấy ở nhiệt độ này trong thời gian 6 giờ. Sau đó nồi hấp tự động được làm lạnh trong bể nước đá, lọc huyền phù thu được, và rửa chất rắn này bằng 50 ml nước và làm khô trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hiệu suất tách là 15,7 g (59,7 mmol) (59%)

bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III), tinh thể màu trắng hơi vàng, độ tinh khiết > 98% (HPLC).

Các số liệu về nhiệt độ nóng chảy và NMR phù hợp với các kết quả từ ví dụ 1.

Ví dụ 7:

Tổng hợp 3,6-bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III) (metionindiketopiperazin, DKP) từ 3-(methylthio)propanaldehyt (3-(methylmercapto)propionaldehyt, MMP) (IIg) theo phương pháp D

Đưa 66,0 g (0,68 mol) $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ vào 100 g nước và làm lạnh xuống nhiệt độ 5°C trong bể nước đá. Sau đó, cho từng giọt axit hydroxyanic 16,6 g (0,61 mol) vừa mới được cất vào trong thời gian 25 phút, trong thời gian đó nhiệt độ của huyền phù được giữ trong khoảng từ 5 đến 10°C . Bổ sung 860 g nước, sau đó thêm từng giọt 60,3 g (0,58 mol) 3-(methylthio)propionaldehyt (IIg) ở nhiệt độ 10°C trong thời gian 80 phút. Độ pH được giữ ở mức không đổi nằm trong khoảng từ 8,5 đến 9 trong thời gian này. Sau đó, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng này đến nhiệt độ 50°C và khuấy ở nhiệt độ này trong thời gian 7 giờ. Sau khi hoàn thành phản ứng này, làm nguội hỗn hợp phản ứng này xuống nhiệt độ 5°C trong bể nước đá và được giữ trong máy lạnh qua đêm. Sáng hôm sau, chuyển hỗn hợp này vào nồi hấp tự động bằng thép dung tích 2 l, gia nhiệt đến nhiệt độ 160°C và khuấy ở nhiệt độ này trong thời gian 6 giờ. Sau đó, làm lạnh nồi hấp tự động trong bể nước đá, lọc huyền phù thu được và rửa bằng 150 ml nước, và làm khô chất rắn này trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hiệu suất tách là 48,6 g (185,2 mmol) (64%) bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III), tinh thể màu trắng hơi vàng, độ tinh khiết > 98% (HPLC).

Các số liệu về nhiệt độ nóng chảy và NMR phù hợp với các kết quả từ ví dụ 1.

Ví dụ 8:

Tổng hợp DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) từ 3,6-bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III) (metionindiketopiperazin, DKP) bằng axit clohydric đặc theo phương pháp E

Tạo huyền phù 655,9 g (2,50 mol) of 3,6-bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III) (DKP) trong 1661 g nước. Trong khi khuấy, cho rất từ từ 271,0 g axit clohydric đặc từng giọt vào và sau đó gia nhiệt cẩn thận, với khuấy trộn rất mạnh, đến hồi lưu. Quá trình tạo bọt mạnh có thể xảy ra trong thời gian này. Hỗn hợp phản ứng này được gia nhiệt đến hồi lưu trong thời gian 5,5 giờ, do đó hoà tan tất cả chất rắn này. Trong quá trình làm lạnh sau đó, DKP (III) không phản ứng kết tủa và được lọc đi. DKP này có thể sử dụng tiếp trong bước thủy phân tiếp trong các phản ứng sau. Sau đó điều chỉnh dịch lọc đến độ pH 6 trong cốc bệse thủy tinh trong bể nước đá bằng nước amoniac nồng độ 32%. DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) được tách ra dưới dạng khối tinh thể dày, và hỗn hợp 50:50 của hai cặp chất đồng phân không đối quang (DL/LD-Met-Met) (DL/DL-I) và (DD/LL-Met-Met) (DD/LL-I) trong thời gian này. Cuối cùng làm khô trong lò sấy ở nhiệt độ 60°C trong chân không. Hiệu suất: 601,0 g (2,14 mol) (85,7%) DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I), chất rắn màu vàng nhạt, độ tinh khiết 98% (HPLC).

$^1\text{H-NMR}$ của DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}+\text{HCl}$): $\delta = 1,86\text{-}2,16$ (m, 4H, 2 x SCH_2CH_2); 2,050 (s, 3H, SCH_3); 2,060 (s, 3H, SCH_3); 2,44-2,64 (m, 4H, 2 x SCH_2); 2,90-4,00 (m, 1H, CH); 4,32-4,42 (m, 1H, CH); 8,45 (bs, 3H, NH_3^+); 8,98-9,08 (m, 1H, 2 x NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ của DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) (125,8 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}+\text{HCl}$): $\delta = 14,33$ (CH_3); 14,38 (CH_3); 27,74; 27,94; 29,51; 30,04; 30,13; 30,89; 30,95; 51,00; 51,29; 51,54 (CH, CH_2); 168,05 (CONH); 168,19 (CONH); 172,55 (COOH); 172,62 (COOH)

Phân tích nguyên tố cho $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ ($M = 280,41$ g/mol):

Theo tính toán: C 42,83; H 7,19; N 9,99; S 22,87

Theo thực nghiệm: C 42,61; H 7,19; N 10,06; S 22,72

Ví dụ 9:

Tổng hợp công nghiệp DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) từ 3,6-bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III) (metionindiketopiperazin, DKP) bằng axit clohydric đặc theo phương pháp E

Cho 500 l nước vào thùng tráng men dung tích 500 l có trang bị máy khuấy, cho 32 l axit clohydric đặc và 78,6 kg of 3,6-bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III) (DKP) vào, và thiết bị này được đóng chặt. Sau đó, gia nhiệt ở nhiệt độ 110°C đồng thời khuấy trong thời gian 2 giờ, trong thời gian đó áp suất tăng lên đến 2,5 bar (250 kPa) và DKP (III) thật ra được hoà tan hoàn toàn. Sau khi phản ứng này hoàn toàn, làm nguội hỗn hợp này xuống nhiệt độ 20°C, và DKP không phản ứng được quay ra ngoài trong ly tâm. Rửa chất rắn này bằng 10 l nước. Sau đó, gom dịch lọc và dịch rửa trong thùng chứa 800 l và sau đó đưa vào thùng có dung tích 500 l để khuấy tiếp. Sau khi bổ sung 2 kg than hoạt tính, tiến hành khuấy ở nhiệt độ 20°C trong thời gian 30 phút. Sau đó lọc huyền phù qua máy lọc ép vào thùng 500 l khác có trang bị máy khuấy. Tiếp theo cho khoảng 28 l dung dịch amoniac đặc vào để kết tủa DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) ở độ pH 6. Trong thời gian này, quá trình kết tủa được ưu tiên ban đầu là cặp chất đồng phân không đối quang raxemic kém tan hơn DL/LD-metionylmetionin (DL/LD-I). Chất này được quay ra và nước cái cô đặc cùng với nước rửa còn một phần tư thể tích ban đầu trong điều kiện chân không bơm hơi ở nhiệt độ bên trong không vượt quá 40°C. Trong thời gian này, cặp chất đồng phân không đối quang raxemic tan nhiều hơn DD/LL-metionylmetionin (DD/LL-I) được kết tinh cùng với lượng nhỏ DL/LD-I hơi tan. Sau khi hoàn thành quá trình chưng cất làm nguội xuống 20°C và ly tâm. Nước cái và nước rửa tách riêng được bỏ đi. Cả hai phần được làm khô trong chân không ở nhiệt độ 70°C. Tổng cộng, có thể thu được 64,2 kg (78%) DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) dưới dạng hỗn hợp của các chất đồng phân không đối quang. Độ tinh khiết > 98% (HPLC).

Các số liệu về nhiệt độ nóng chảy và NMR phù hợp với các kết quả từ ví dụ 8.

Ví dụ 10:

Tổng hợp DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) từ 3,6-bis[2-(metylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III) (metionindiketopiperazin, DKP) trong điều kiện kiềm, ví dụ bằng amoniac theo phương pháp F

Gia nhiệt 65,6 g (0,25 mol) 3,6-bis[2-(metylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III) (DKP), 70 ml dung dịch amoniac nồng độ 25% và 500 ml nước ở nhiệt độ 150°C trong nồi hấp tự động trong thời gian 2 giờ. Sau khi làm nguội, DKP (III) (16,0 g = 24,4%) chưa phản ứng được lọc đi bằng cách hút. Chất này có thể được sử dụng tiếp trong mẻ tiếp theo. Cô đặc dịch lọc trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở nhiệt độ nước là 80-90°C cho đến khi các tinh thể đầu tiên được tách riêng ra. Sau khi làm nguội và để yên qua đêm, có thể phân tách sau bước lọc và làm khô thu được tổng số 49,3 g (70,3%) DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) dưới dạng hỗn hợp 50:50 của hai cặp chất đồng phân không đối quang DL/DL-I và DD/LL-I dưới dạng chất rắn màu trắng. Độ tinh khiết 98% (HPLC).

Các số liệu về nhiệt độ nóng chảy và NMR phù hợp với các kết quả từ ví dụ 8.

Ví dụ 11:

Tinh chế DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I)

Tạo huyền phù 500 g DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) trong 7800 g nước khử ion (pH 5,3). Điều chỉnh độ pH ở nhiệt độ 26°C đến 1,0 bằng 346,6 g axit sulfuric 50% khối lượng. Metionylmetionin được hoà tan hoàn toàn. Để làm trong, cho 18 g than hoạt tính vào dung dịch đục hơi vàng và khuấy trong thời gian 60 phút. Than hoạt tính được lọc đi, và điều chỉnh dung dịch không màu trong này đến độ pH 5,6 bằng 228 g dung dịch amoniac 32% khối lượng. Dung dịch này được để yên qua đêm. Chất rắn kết tủa màu trắng được lọc đi bằng cách hút và làm khô trong lò sấy ở nhiệt độ 50°C trong chân không. Hiệu suất: 460,5 g (92%) DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I), chất rắn màu trắng sáng, độ tinh khiết > 99% (HPLC).

Số liệu NMR này phù hợp với các kết quả từ ví dụ 8.

Ví dụ 12:

Tổng hợp DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) từ N-carbamoylmetionin (IIa) và DL-metionin bằng KOH theo phương pháp G

Hoà tan 13,4 g (0,09 mol) DL-metionin, 17,5 g (0,09 mol, độ tinh khiết: 99%) N-carbamoylmetionin (IIa) và 11,9 g (0,18 mol) KOH tinh khiết 85% trong 150 ml nước và khuấy ở nhiệt độ 150°C trong nồi hấp tự động Roth dung tích 200 ml bằng máy khuấy từ trong thời gian 5 giờ, trong thời gian đó áp suất tăng lên đến 6 bar (600 kPa). Sau khi phản ứng hoàn toàn, làm nguội nồi hấp tự động, và 3,6-bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III) (metionindiketopiperazin, DKP) kết tủa được lọc đi và rửa bằng một chút nước. Nước rửa và nước cái được kết hợp lại và cô đặc xuống thể tích 130 ml trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở nhiệt độ 40°C. Chuyển dòng CO₂ trung bình qua dung dịch thu được cho đến khi đạt được độ pH bằng 6,4 và chất rắn màu trắng kết tủa. Chất này được lọc đi, rửa bằng một chút nước lạnh và làm khô trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hiệu suất tách là 11,4 g (40,6 mmol) (45%) DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I), chất rắn màu trắng, độ tinh khiết > 98% (HPLC).

Số liệu NMR này phù hợp với các kết quả từ ví dụ 8.

Ví dụ 13:

Tổng hợp DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) từ 5-[2-(methylthio)ethyl]-2,4-imidazolidindion (IIId) (metioninhydantoin) và DL-metionin bằng KOH theo phương pháp G

Hoà tan 13,4 g (0,09 mol) DL-metionin, 17,2 g (0,09 mol, độ tinh khiết: 91%) metioninhydantoin (IIId) và 8,9 g (0,135 mol) KOH tinh khiết 85% trong 150 ml nước và khuấy ở nhiệt độ 150°C trong nồi hấp tự động Roth dung tích 200 ml bằng máy khuấy từ trong thời gian 5 giờ, trong thời gian đó áp suất tăng lên đến 8 bar (800 kPa). Sau khi phản ứng này xảy ra hoàn toàn, làm nguội nồi hấp tự động, lọc huyền phù thu được và rửa 3,6-bis[2-(methylthio)ethyl]-2,5-piperazindion (III)

(metioninđiketopiperazin, DKP) kết tủa một vài lần bằng một chút nước. Nước cái và nước rửa được kết hợp lại, và cô đặc dung dịch thu được đến thể tích 125 ml trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở nhiệt độ 40°C. Dịch cô đặc này được trung hoà cẩn thận bằng axit clohydric đặc. Chất rắn màu trắng được kết tủa khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng và ở độ pH 5,8 qua đêm. Chất rắn này được lọc đi, rửa bằng một chút nước lạnh và làm khô trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hiệu suất tách là 17,5 g (62,4 mmol) (69%) DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I), chất rắn màu trắng, độ tinh khiết > 98% (HPLC).

Số liệu NMR này phù hợp với các kết quả từ ví dụ 8.

Ví dụ 14:

Tổng hợp DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) từ 5-[2-(metylthio)etyl]-2,4-imidazolidinđion (IIId) (metioninhydantoin) và DL-metionin bằng K₂CO₃ theo phương pháp G

Hoà tan 13,4 g (0,09 mol) DL-metionin, 17,2 g (0,09 mol, độ tinh khiết: 91%) metioninhydantoin (IIId) và 12,4 g (0,09 mol) K₂CO₃ trong 150 ml nước và khuấy ở nhiệt độ 150°C trong nồi hấp tự động Roth dung tích 200 ml bằng máy khuấy từ trong thời gian 5 giờ, trong thời gian đó áp suất tăng lên đến 12 bar (1200 kPa). Sau khi phản ứng này xảy ra hoàn toàn, làm nguội nồi hấp tự động, và 3,6-bis[2-(metylthio)etyl]-2,5-piperazinđion (III) (metioninđiketopiperazin, DKP) kết tủa được lọc đi và rửa bằng một chút nước. Nước rửa và nước cái được kết hợp và cô đặc đến thể tích 135 ml trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở nhiệt độ 40°C. Sau đó, chuyển dòng CO₂ vừa phải vào dung dịch thu được cho đến khi đạt được đến độ pH 6,8 và chất rắn màu trắng kết tủa. Chất này được lọc đi, rửa bằng một chút nước lạnh và làm khô trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hiệu suất: 14,3 g (60,0 mmol) (57%) DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I), chất rắn màu trắng, độ tinh khiết > 99% (HPLC).

Số liệu NMR này phù hợp với các kết quả từ ví dụ 8.

Ví dụ 15:

Tổng hợp DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) từ 5-[2-(metylthio)etyl]-2,4-imidazolidindion (IIId) (metioninhydantoin) và DL-metionin bằng KHCO_3 theo phương pháp G

Hoà tan 13,4 g (0,09 mol) DL-metionin, 17,2 g (0,09 mol, độ tinh khiết: 91%) metioninhydantoin (IIId) và 9,1 g (0,09 mol) KHCO_3 trong 150 ml nước và khuấy ở nhiệt độ 150°C trong nồi hấp tự động Roth dung tích 200 ml bằng máy khuấy từ trong thời gian 5 giờ, trong thời gian đó áp suất tăng lên đến 12 bar (1200 kPa). Sau khi phản ứng này xảy ra hoàn toàn, làm nguội nồi hấp tự động, và 3,6-bis[2-(metylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III) (metionindiketopiperazin, DKP) kết tủa được lọc đi và rửa bằng một chút nước. Nước rửa và nước cái được kết hợp lại và cô đặc đến thể tích 120 ml trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở nhiệt độ 40°C . Sau đó, chuyển dòng trung bình CO_2 vào dung dịch thu được cho đến khi đạt được đến độ pH 6,3 và chất rắn màu trắng kết tủa. Chất này được lọc đi, rửa bằng một chút nước lạnh và làm khô trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hiệu suất: 16,0 g (57,1 mmol) (63%) DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I), chất rắn màu trắng, độ tinh khiết > 99% (HPLC).

Số liệu NMR này phù hợp với các kết quả từ ví dụ 8.

Ví dụ 16:

Tổng hợp DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) từ 2-amino-4-(metylthio)butanoamit (IIc) (metioninamit) và DL-metionin bằng $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ theo phương pháp H

Hoà tan 8,3 g (0,045 mol) 2-amino-4-(metylthio)butanoamit (IIc) hydroclorua, 6,7 g (0,045 mol) metionin, 4,3 g (0,045 mol) $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ và 3,0 g (0,045 mol) KOH tinh khiết 85% trong 75 g of nước và khuấy ở nhiệt độ 160°C trong nồi hấp tự động Roth dung tích 200 ml bằng máy khuấy từ trong thời gian 6 giờ. Sau đó nồi hấp tự động được làm lạnh trong bể nước đá, lọc huyền phù thu được ra, và rửa 3,6-bis[2-(metylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III) (metionindiketopiperazin, DKP) kết tủa bằng một chút nước. Nước rửa và nước cái được kết hợp lại và cô đặc đến thể tích 70 ml

trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở nhiệt độ 40°C. Sau đó, chuyển dòng CO₂ trung bình vào dung dịch thu được cho đến khi đạt được độ pH bằng 6,3 và chất rắn màu trắng kết tủa. Chất này được lọc đi, rửa bằng một chút nước lạnh và làm khô trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hiệu suất: 7,8 g (27,8 mmol) (62%) DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I), chất rắn màu trắng, độ tinh khiết > 98% (HPLC).

Số liệu NMR này phù hợp với các kết quả từ ví dụ 8.

Ví dụ 17:

Tổng hợp DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) từ 2-hydroxy-4-(methylthio)butannitril (IIe) (3-(methylmercapto)propionaldehyd xyanohydrin, MMP-CH) và DL-metionin bằng NH₄HCO₃ theo phương pháp H

Cho từ từ từng giọt 15,2 g (0,116 mol) 2-hydroxy-4-(methylthio)butannitril (IIe) ở nhiệt độ trong phòng vào huyền phù chứa 11,1 g (0,141 mol = 1,22 đương lượng) NH₄HCO₃ trong 10 g nước và khuấy trong thời gian 2 h. NH₄HCO₃ được hoà tan trong thời gian này. Sau đó, cho 180 g nước vào và khuấy dung dịch thu được ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 7 h và ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Sáng hôm sau, cho 17,3 g (0,116 mol) metionin, 7,7 g (0,116 mol) KOH tinh khiết 85% và một phần 180 g nước nữa vào, và chuyển hỗn hợp phản ứng này vào nồi hấp tự động bằng thép dung tích 1 l, gia nhiệt đến nhiệt độ 160°C và khuấy ở nhiệt độ này trong thời gian 6 giờ. Sau đó nồi hấp tự động được làm lạnh trong bể nước đá, lọc huyền phù thu được, và rửa 3,6-bis[2-(methylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III) (metioninđiketo-piperazin, DKP) kết tủa bằng 100 ml nước. Nước cái và nước rửa được kết hợp, và cô đặc dung dịch thu được đến thể tích 160 ml trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở nhiệt độ 40°C. Dịch đặc này trung hoà cẩn thận bằng axit sulfuric nồng độ 50%. Chất rắn màu trắng được kết tủa khi khuấy ở nhiệt độ trong phòng và ở độ pH 5,4 qua đêm. Chất rắn này được lọc đi, rửa bằng một chút nước lạnh và làm khô trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hiệu suất: 15,2 g (54,2 mmol) (47%) DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I), chất rắn màu trắng, độ tinh khiết > 99% (HPLC).

Số liệu NMR này phù hợp với các kết quả từ ví dụ 8.

Ví dụ 18:

Tổng hợp DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) từ 2-amino-4-(methylthio)butannitril (II_f) (metioninnitril) bằng CO₂ và DL-metionin theo phương pháp H

Chuyển dòng trung bình CO₂ vào dung dịch chứa 26,2 g (0,201 mol) 2-amino-4-(methylthio)butannitril (II_f) trong 330 g nước trong thời gian 3 giờ, trong thời gian đó nhiệt độ tăng lên đến 45°C và độ pH được giữ ở mức 8. Sau đó, khuấy tiếp tục ở nhiệt độ trong phòng qua đêm. Sáng hôm sau, trộn hỗn hợp phản ứng này với 30,0 g (0,201 mol) metionin và 13,3 g (0,201 mol) KOH tinh khiết 85% và chuyển vào nồi hấp tự động bằng thép dung tích 1 l, gia nhiệt đến nhiệt độ 160°C và khuấy ở nhiệt độ này trong thời gian 6 giờ. Sau đó nồi hấp tự động được làm lạnh trong bể nước đá, lọc huyền phù thu được, và rửa 3,6-bis[2-(methylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III) (metionindiketopiperazin, DKP) kết tủa bằng một chút nước. Nước rửa và nước cái được kết hợp và cô đặc đến thể tích 280 ml trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở nhiệt độ 40°C. Sau đó, chuyển dòng trung bình CO₂ vào dung dịch thu được cho đến khi đạt được độ pH 6,0 và chất rắn màu trắng kết tủa. Chất này được lọc đi, rửa bằng một chút nước lạnh và làm khô trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hiệu suất: 32,7 g (116,6 mmol) (58%) DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I), chất rắn màu trắng, độ tinh khiết > 98% (HPLC).

Số liệu NMR này phù hợp với các kết quả từ ví dụ 8.

Ví dụ 19:

Tổng hợp DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) từ 3-(methylthio)propanaldehyt (II_g) (MMP) bằng axit hydroxyanic, amoni cacbonat và DL-metionin theo phương pháp J

Cho 66,0 g (0,68 mol) (NH₄)₂CO₃ vào 100 g nước và làm lạnh xuống nhiệt độ 5°C trong bể nước đá. Sau đó cho từng giọt 16,55 g (0,612 mol) axit hydroxyanic vừa

mới được cất vào trong thời gian 25 phút, trong thời gian đó nhiệt độ của huyền phù được giữ từ 5 đến 10°C. Sau khi đã cho 500 g nước vào, cho từng giọt 60,3 g (0,58 mol) 3-(metylthio)propionalđehyt (IIg) vào ở nhiệt độ 10°C trong thời gian 80 phút. Độ pH được giữ ở mức không đổi nằm trong khoảng từ 8,5 đến 9 trong thời gian này. Sau đó, gia nhiệt hỗn hợp phản ứng này đến nhiệt độ 50°C và khuấy ở nhiệt độ này trong thời gian 7 giờ. Sau khi phản ứng này xảy ra hoàn toàn, làm nguội hỗn hợp phản ứng xuống nhiệt độ 5°C trong bể nước đá và bảo quản trong máy lạnh qua đêm. Sáng hôm sau, cho 86,5 g (0,58 mol) axit 2-amino-4-(metylthio)butanoic (metionin), 38,3 g (0,58 mol) KOH tinh khiết 85% (0,58 mol), và một phần 530 g nước nữa vào. Hỗn hợp này được chuyển vào nồi hấp tự động bằng thép dung tích 2 l, gia nhiệt đến nhiệt độ 160°C và khuấy ở nhiệt độ này trong thời gian 6 giờ. Sau đó nồi hấp tự động được làm lạnh trong bể nước đá, lọc huyền phù thu được, và 3,6-bis[2-(metylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III) (metioninđiketopiperazin, DKP) kết tủa được rửa bằng một chút nước. Nước rửa và nước cái được kết hợp lại và cô đặc đến thể tích 800 ml trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở nhiệt độ 40°C. Sau đó, chuyển dòng trung bình CO₂ vào dung dịch thu được cho đến khi đạt được độ pH 6,0 và chất rắn màu trắng kết tủa. Chất này được lọc ra, rửa bằng một chút nước lạnh và làm khô trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hiệu suất: 85,1 g (0,30 mol) (52%) DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I), chất rắn màu trắng, độ tinh khiết > 98% (HPLC).

Số liệu NMR này phù hợp với các kết quả từ ví dụ 8.

Ví dụ 20:

Tách hai cặp chất đồng phân không đối quang DD/LL-metionylmetionin (DD/LL-I) và DL/LD-metionylmetionin (DL/LD-I) bằng cách kết tinh phân đoạn từ DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) theo phương pháp K

a) DL/LD-metionylmetionin (DL/LD-I):

Tạo huyền phù 290,4 g DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I) (hỗn hợp 50:50 của DD/LL-I và DL/LD-I) trong 2614 g nước khử ion và điều chỉnh độ pH đến 0,6 bằng 381,7 g axit sulfuric nồng độ 50% theo khối lượng. Điều chỉnh dung dịch trong

không màu này đến độ pH 5,6 bằng 265,9 g dung dịch amoniac 32% theo khối lượng, và chất kết tủa màu trắng thu được được lọc đi bằng cách hút (580,9 g ẩm). Cuối cùng làm khô chất rắn này trong lò sấy trong chân không ở nhiệt độ 50°C. Hiệu suất là 126,2 g (86,9%) DL/LD-metionylmetionin (DL/LD-I), chất rắn màu trắng, độ tinh khiết > 98% (HPLC), khoảng nhiệt độ nóng chảy 232-233°C (phân hủy).

¹H-NMR của DL/LD-metionylmetionin (DL/LD-I) (500 MHz, D₆-DMSO+HCl): 1,88-2,12 (m, 4H, 2 x SCH₂CH₂); 2,031 (s, 3H, CH₃); 2,041 (s, 3H, CH₃); 2,48-2,56 (m, 4H, 2 x SCH₂); 3,87-3,95 (m, 1H, CH); 4,30-4,38 (m, 1H, CH); 8,429 (d, 3H, ³J = 4,4Hz, NH₃⁺); 9,034 (d, 1H, ³J = 8,0Hz, NH)

¹³C-NMR của DL/LD-metionylmetionin (DL/LD-I) (125,8 MHz, D₆-DMSO+HCl): 14,57 (CH₃); 14,62 (CH₃); 28,19; 29,75; 30,28; 31,19; 51,25 (CH); 51,79 (CH); 168,29 (CONH); 172,80 (COOH)

Độ tan (nước, 20°C): 0,4 g/l

b) DD/LL-metionylmetionin (DD/LL-I):

Cô đặc nước cái không màu từ bước a) trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở nhiệt độ 35°C trong điều kiện chân không bằng bơm nước. Thu được huyền phù màu trắng. Sau đó lọc tách chất rắn màu trắng bao gồm amoni sulfat, phần còn lại DL/LD-I và hợp chất đích bằng cách hút và làm khô trong chân không ở nhiệt độ 50°C. Ba chất rắn này được tách riêng bằng cách tạo huyền phù hỗn hợp này trong nước khử ion và khuấy trộn. DL/LD-I không hòa tan được lọc đi bằng cách hút, và cô đặc nước cái đến còn khoảng một phần năm trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở nhiệt độ 50°C trong điều kiện chân không bằng bơm nước. Sau khi để yên trong thời gian dài, DD/LL-metionylmetionin (DD/LL-I) được kết tinh dưới dạng chất rắn màu trắng. Cuối cùng, chất này được lọc tách bằng cách hút và làm khô trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C. Hiệu suất là 78,2 g (53,9%) tính theo DD/LL-metionylmetionin (DD/LL-I), chất rắn màu trắng, > 96% (HPLC), khoảng nhiệt độ nóng chảy 226-227°C (phân hủy).

$^1\text{H-NMR}$ của DD/LL-metionylmetionin (DD/LL-I) (500 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}+\text{HCl}$): 1,84-2,12 (m, 4H, 2 x SCH_2CH_2); 2,044 (s, 3H, CH_3); 2,046 (s, 3H, CH_3); 2,48-2,62 (m, 4H, 2 x SCH_2); 3,89-3,97 (m, 1H, CH); 4,33-4,40 (m, 1H, CH); 8,422 (d, 3H, $^3J = 4,0\text{Hz}$, NH_3^+); 9,065 (d, 1H, $^3J = 7,5\text{Hz}$, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ của DD/LL-metionylmetionin (DD/LL-I) (125,8 MHz, $\text{D}_6\text{-DMSO}+\text{HCl}$): 14,56 (CH_3); 14,57 (CH_3); 27,97; 29,73; 30,35; 31,11; 51,22 (CH); 51,50 (CH); 168,41 (CONH); 172,83 (COOH)

Độ tan (nước, 20°C): 21,0 g/l

Ví dụ 21:

Raxemic hóa hai cặp chất đồng phân không đối quang DD/LL-metionylmetionin (DD/LL-I) và DL/LD-metionylmetionin (DL/LD-I) trong điều kiện kiềm

a) Raxemic hóa DL/LD-metionylmetionin (DL/LD-I)

Hoà tan 12,6 g (45,0 mmol) cặp chất đồng phân không đối quang DL/LD-metionylmetionin (DL/LD-I) cùng với 3,1 g (22,5 mmol) K_2CO_3 trong 75 ml nước trong bình phản ứng thí nghiệm Roth có dung tích 200 ml và gia nhiệt đến nhiệt độ 160°C đồng thời khuấy. Áp suất tăng lên đến 7 bar (700 kPa) trong thời gian này. Sau 6 giờ ở nhiệt độ này, làm nguội nồi hấp tự động trong bể nước đá. Sau đó, lọc huyền phù thu được, và lọc chất rắn này đi, rửa một số lần bằng nước và làm khô trong lò sấy trong chân không ở nhiệt độ 50°C . Hiệu suất tách là 6,5 g (24,8 mmol) (55%) bis[2-(metylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III), tinh thể màu trắng hơi vàng, độ tinh khiết > 98%, nhiệt độ nóng chảy $234\text{-}236^\circ\text{C}$; tỷ lệ chất đồng phân không đối quang: 52:48 (DD/LL-III : *meso*-III). Nước rửa và nước cái được kết hợp lại và cô đặc đến thể tích 25 ml trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở nhiệt độ 40°C . Sau đó, cho dòng CO_2 trung bình đi vào dung dịch thu được cho đến khi độ pH đạt đến 6,0 và chất rắn màu trắng kết tủa. Chất này được lọc ra, rửa bằng một chút nước lạnh và làm khô trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hiệu suất tách là 5,7 g (20,3 mmol) (45%)

DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I), chất rắn màu trắng, độ tinh khiết > 98% (HPLC).

Số liệu NMR này phù hợp với các kết quả từ ví dụ 8.

a) Raxemic hóa DL/LD-metionylmetionin (DD/LL-I)

Hoà tan 12,6 g (45,0 mmol) DD/LL-metionylmetionin (DD/LL-I) cùng với 4,5 g (45,0 mmol) KHCO_3 trong 75 ml nước trong bình phản ứng phòng thí nghiệm Roth có dung tích 200 ml và gia nhiệt đến 160°C trong khi là khuấy. Áp suất tăng lên đến 7 bar (700 kPa) và, sau 6 giờ ở nhiệt độ này, làm nguội nồi hấp tự động trong bể nước đá. Sau đó lọc huyền phù thu được, và rửa vài lần chất rắn lọc được bằng nước và làm khô trong lò sấy trong chân không ở nhiệt độ 50°C . Hiệu suất tách là 6,0 g (22,9 mmol) (51%) bis[2-(methylthio)etyl]-2,5-piperazindion (III), tinh thể màu trắng hơi vàng, độ tinh khiết > 98% (HPLC), nhiệt độ nóng chảy $233\text{--}236^\circ\text{C}$; tỷ lệ chất đồng phân không đối quang: 54:46 (DD/LL-III: *meso*-III). Nước rửa và nước cái được kết hợp lại và cô đặc đến thể tích 25 ml trong thiết bị làm bay hơi kiểu quay ở nhiệt độ 40°C . Sau đó, chuyển dòng CO_2 trung bình vào dung dịch thu được cho đến khi độ pH đạt đến 6,0 và chất rắn màu trắng kết tủa. Chất này được lọc đi, rửa bằng một chút nước lạnh và làm khô trong lò sấy chân không ở nhiệt độ 50°C qua đêm. Hiệu suất tách là 5,5 g (19,6 mmol) (44%) DD/LL/DL/LD-metionylmetionin (I), chất rắn màu trắng, độ tinh khiết > 98% (HPLC).

Số liệu NMR này phù hợp với các kết quả từ ví dụ 8.

Ví dụ 22:

Thử nghiệm phân cắt *in vitro* DL-metionyl-DL-metionin (I) bằng enzyme tiêu hóa từ ăn tạp cá chép

a) Phân tách enzyme tiêu hóa từ cá chép Nhật (*Cyprinus carpio morpha noblis*)

Phương pháp phân tách enzym tiêu hóa dựa trên phương pháp của EID và MATTY (Aquaculture 1989, 79, 111-119). Cho mục đích này, ruột của năm con cá chép Nhật một năm tuổi (*Cyprinus carpio morpha noblis*) được lấy ra, rửa bằng nước và cắt mở theo chiều dài, và trong mỗi trường hợp niêm mạc ruột được nạo ra. Chất này được nghiền nhỏ cùng với đá nghiền bằng cách sử dụng máy khuấy. Xử lý huyền phù thu được bằng đầu dò siêu âm để làm phá vỡ các tế bào vẫn còn nguyên vẹn. Tách các thành phần tế bào và chất béo bằng cách ly tâm huyền phù ở nhiệt độ 4°C trong thời gian 30 phút, và dịch đồng nhất này được lắng gạn và được tiệt trùng bằng lượng vết thimerosal. Thu được 260,7 ml dung dịch enzym từ niêm mạc ruột của 5 con cá chép Nhật, và dung dịch này được bảo quản trong điều kiện tối ở nhiệt độ 4°C.

b) Quy trình khảo sát sự phân cắt in vitro

DL-metionyl-DL-metionin (I) và cặp chất đồng phân không đối quang tương ứng DD/LL-I và DL/LD-I được cho vào dung dịch đệm TRIS/HCl và được trộn với dung dịch enzym. Trong mỗi trường hợp chuẩn bị mẫu trống không có dung dịch enzym để so sánh và đánh giá vận tốc phân cắt hóa học tinh khiết. Thỉnh thoảng lấy mẫu ra, và phát hiện thành phần của chúng và định lượng nhờ HPLC đã hiệu chuẩn. Xác định mức chuẩn hóa là thương số của diện tích metionin cho diện tích metionylmetionin (I) (tham khảo Fig. 6 và 7).

Bảng 1

		Mẫu	Mẫu trống
Trước khi nạp	Chất nền	0,143 mmol	0,143 mmol
	Met-Met (I)	(40,1 mg)	(40,1 mg)
	Dung dịch đệm	5,7 ml	8,3 ml
	TRIS/HCl, pH 9,5		
Phản ứng bắt đầu	Dung dịch enzym ($\pm$ 5% dung dịch cá chép)	2,6 ml	---

Phản ứng	37°C	37°C
Làm ngừng phản ứng	Cho 0,2 ml dung dịch phản ứng vào 9,8 ml dung dịch H_3PO_4 nồng độ 10%.	

Ví dụ 23:

Thử nghiệm phân cắt *in vitro* DL-metionyl-DL-metionin (I) bằng enzym tiêu hóa từ cá hồi ăn thịt

a) Phân tách enzym tiêu hóa từ cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*)

Phương pháp phân tách enzym tiêu hóa được dựa trên phương pháp của EID và MATTY (Aquaculture 1989, 79, 111-119). Cho mục đích này, ruột của sáu con cá hồi vân một năm tuổi (*Oncorhynchus mykiss*) được mở ra và được xử lý như mô tả ở ví dụ 22.

b) Quy trình khảo sát sự phân cắt *in vitro*

Thực hiện khảo sát *in vitro* tương tự với ví dụ 22 (tham khảo Fig. 8 và 9).

Bảng 2

		Mẫu	Mẫu trống
Trước khi nạp	Chất nền	0,143 mmol	0,143 mmol
	Met-Met(I)	(40,1 mg)	(40,1 mg)
	Dung dịch đệm	5,7 ml	9,8 ml
	TRIS/HCl, pH 9,5		
Bắt đầu phản ứng	Dung dịch enzym ($\pm$ 10% dung dịch cá hồi)	4,2 ml	---
Phản ứng		37°C	37°C
Làm dừng phản ứng	0,2 ml dung dịch phản ứng được cho vào 9,8 ml of dung dịch H_3PO_4 nồng độ 10%.		

Ví dụ 24:

Thử nghiệm phân cắt *in vitro* trên DL-metionyl-DL-metionin (I) bằng enzym tiêu hóa từ tôm ăn tạp

a) Phân tách enzym tiêu hóa từ tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus Vannamei*)

Phương pháp phân tách enzym tiêu hóa được dựa trên phương pháp của Ezquerro và Garcia-Carreno (J. Food Biochem. 1999, 23, 59-74). Cho mục đích này, gan tụy được lấy ra từ năm kilogam tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus Vannamei*) và được nghiền cùng với đá nghiền bằng máy khuấy. Quá trình xử lý tiếp theo được thực hiện tương tự với ví dụ 22.

b) Quy trình khảo sát sự phân cắt *in vitro*

Thực hiện khảo sát *in vitro* tương tự với ví dụ 22 (tham khảo Fig. 10 và 11).

Bảng 3

		Mẫu	Mẫu trống
Trước khi nạp	Chất nền	0,143 mmol	0,143 mmol
	Met-Met (I)	(40,1 mg)	(40,1 mg)
	Dung dịch đệm	5,7 ml	7,9 ml
	TRIS/HCl, pH 9,5		
Bắt đầu phản ứng	Dung dịch enzym ($\cong$ 2 tôm)	2,2 ml	---
Phản ứng		37 °C	37 °C
Làm dừng phản ứng	Cho 0,2 ml dung dịch phản ứng vào 9,8 ml dung dịch H ₃ PO ₄ nồng độ 10%.		

Ví dụ 25:

Sự chuyển hóa sinh học của D- thành L-metionin bằng enzym từ ruột, gan và tụy cá chép Nhật Bản

a) Phân tách enzym tiêu hóa từ cá chép Nhật (*Cyprinus carpio morpha noblis*)

Phương pháp phân tách enzym tiêu hóa được dựa trên phương pháp của EID và MATTY (Aquaculture 1989, 79, 111-119). Cho mục đích này, ruột của năm con cá chép Nhật một năm tuổi (*Cyprinus carpio morpha noblis*) được lấy ra và được xử lý như mô tả ở ví dụ 22. Để phân tách enzym từ gan, gan được tách ra, làm đồng nhất hoá và được xử lý tương tự với phương pháp lấy enzym từ ruột ở ví dụ 22. Quy trình phân tách enzym từ tụy cũng tương tự với phương pháp này.

b) Quy trình chuyển hóa sinh học *in vitro* D- thành L-metionin

Cho D-metionin vào dung dịch đệm, và cho dung dịch enzym vào. Mẫu trống không chứa dung dịch enzym được pha trong mỗi trường hợp để so sánh và để ước tính mức độ chuyển hóa học tinh khiết. Sau 24 giờ, lấy mẫu ra và phát hiện và định lượng thành phần nhờ HPLC đã hiệu chuẩn. Xác định mức chuyển hóa là thương số của diện tích L-metionin cho diện tích D-metionin (tham khảo Fig. 4).

Bảng 4

		Mẫu	Mẫu trống
Trước khi nạp	Chất nền	0,143 mmol	0,143 mmol
	D-Metionin	(21,3 mg)	(21,3 mg)
	Dung dịch đệm	11,7 ml	23,4 ml
Bắt đầu phản ứng	Hỗn hợp enzym ($\pm$ 5% dung dịch cá chép)	11,7 ml	---
Phản ứng		37°C	37°C
Làm dừng phản ứng	Cho 0,2 ml dung dịch phản ứng vào 9,8 ml dung dịch H ₃ PO ₄ nồng độ 10%.		

Các dung dịch đệm:

Dung dịch đệm xitrat: pH 5, pH 6 và pH 7

Dung dịch đệm phosphat: pH 8

Dung dịch đệm TRIS/HCl:pH 9

Hỗn hợp enzym bao gồm enzym của ruột, gan và tuyến tụy ($\cong$ 5% dung dịch từ cá chép):

2,6 ml dung dịch enzym từ niêm mạc ruột

3,5 ml dung dịch enzym từ gan

5,6 ml dung dịch enzym từ tụy

Ví dụ 26:

Các đặc tính ngấm chiết của hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang metionylmetionin LL/DD/LD/DL-I, DD/LL-I và DL/LD-I từ viên nhỏ thức ăn so với DL-metionin, MHA và canxi MHA

Hỗn hợp thức ăn: Chất nền thức ăn được sử dụng là hỗn hợp thức ăn không chứa metionin gồm các thành phần thông thường chẳng hạn như đồ ăn từ đậu nành, dầu đậu nành, tinh bột ngô, đồ ăn từ lúa mì, đồ ăn từ cá, xenluloza, axit amin thiết yếu ở dạng tinh thể và các chất khoáng và các vitamin như là các thành phần ban đầu. Sau đó, hỗn hợp này được bổ sung trong từng mẻ trong mẻ 20 kg trong mỗi trường hợp với dẫn xuất metionin được nêu trong Bảng 5, với mức độ bổ sung 0,25% (tính theo lượng lưu huỳnh tương đương), và được làm đồng nhất hoá và sau đó được tạo viên bằng cách xử lý dòng. So sánh với metionylmetionin (I), thực hiện thử nghiệm tạo viên nhỏ trong mỗi trường hợp với DL-metionin, MHA (chất tương tự metionin hydroxy) và canxi MHA. Ngoài ra, tiến hành thử nghiệm đối chứng bằng cách tạo viên nhỏ mà không bổ sung dẫn xuất metionin (tham khảo bảng 5).

Bảng 5

Số	Dẫn xuất metionin	Độ tinh khiết (wt%)	Phân tử lượng (monome)	Trọng lượng ban đầu
1	Không có chất phụ gia	---	---	0,00 g
2	DL-metionin	99,0%	149,21	50,61 g
3	MHA	88,0%	150,19	57,14 g
4	Canxi MHA (MHA-Ca)	93,3%	169,22	60,77 g
5	DD/LL/DL/LD metionyl-metionin (I)	99,7%	140,20	47,13 g

Tất cả các chất đồng phân không đối quang của metionylmetionin (I) vẫn giữ ổn định trong suốt quá trình tạo viên nhỏ và xử lý bằng hơi (tham khảo bảng 6).

Bảng 6

Mẫu Thông số		Hỗn hợp thức ăn không được bổ sung	Hỗn hợp thức ăn được bổ sung Met-Met (I)	Viên nhỏ thức ăn được bổ sung Met-Met (I)
CP	%	18,64	18,88	18,45
DM	%		85,58	86,58
MET	%	0,28	0,47	0,51
CYS	%	0,32	0,32	0,30
MET+CYS	%	0,59	0,79	0,81
LYS	%	1,00	0,99	0,98
THR	%	0,67	0,70	0,67
ARG	%	1,16	1,19	1,17
ILE	%	0,75	0,79	0,74
LEU	%	1,54	1,60	1,51
VAL	%	0,88	0,90	0,85
HIS	%	0,47	0,51	0,48
PHE	%	0,91	0,92	0,88
GLY	%	0,78	0,81	0,77
SER	%	0,89	0,94	0,90
ALA	%	0,89	0,93	0,89
ASP	%	1,74	1,75	1,70
GLU	%	3,62	3,79	3,58
MET-MET (I)	Ex		0,156	0,153
MET	Ex		0,017	0,022
LYS	Ex		0,092	0,104

(Ex: Thành phần hóa tan)

Trong trường hợp này, việc xác định axit amin dựa trên phương pháp EU 98/64/EC. Sau khi chiết axit amin tự do và metionylmetionin (I), sau đó xác định các chất này nhờ bộ phân tích axit amin bằng cách tạo dẫn xuất hóa sau cột bằng ninhydrin (tham khảo bảng 6).

Sau đó, khảo sát các đặc tính ngâm chiết của các chất đồng phân không đối quang của metionylmetionin (I) từ viên nhỏ thức ăn trong nước. Trong trường hợp này, xác định sự hoà tan ra của metionylmetionin trong nước như là hàm số phụ thuộc vào thời gian, nhiệt độ, thành phần nước (nước mặn hoặc nước ngọt). Cho mục đích này, cho 20,0 g viên nhỏ thức ăn vào túi rây có lưới đóng và ngâm hoàn toàn trong 200 g nước trong bình thót cổ Erlenmeyer. Sau đó, tất cả các chất trong bình thót cổ Erlenmeyer được khuấy liên tục bằng máy lắc phòng thí nghiệm ở nhiệt độ không đổi 20°C. Sau đó, cứ cách một khoảng thời gian nhất định, lấy mẫu trong mỗi trường hợp và xác định hàm lượng của cặp các chất đồng phân không đối quang metionylmetionin đơn lẻ trong nước bằng HPLC (tham khảo bảng 7).

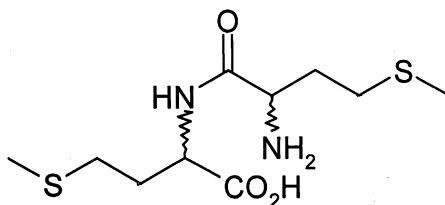
Bảng 7

Thời gian	Metionin	MHA	MHA-Ca	LL/DD-I	DL/LD-I	LL/DD/LD/DL-I
0	4,0%	6,0%	8,6%	2,7%	0,6%	1,5%
5	12,0%	12,8%	16,5%	3,7%	0,7%	2,0%
10	16,0%	20,8%	28,2%	6,5%	0,9%	3,2%
15	24,0%	28,8%	39,4%	7,7%	0,6%	3,6%
30	39,9%	50,5%	61,7%	12,1%	0,6%	5,4%
60	59,9%	75,4%	82,4%	20,6%	1,7%	9,5%
120	79,8%	94,1%	94,1%	27,4%	1,7%	12,3%
210	87,8%	99,9%	97,0%	35,9%	3,8%	17,0%

Để so sánh, trong mỗi trường hợp, khảo sát viên nhỏ thức ăn được bổ sung DL-metionin, MHA hoặc canxi MHA trong cùng điều kiện và do đó xác định các đặc tính ngâm chiết của chúng trong nước trong điều kiện tương ứng (tham khảo Fig. 5 và bảng 7).

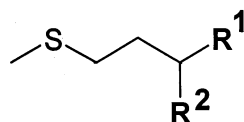
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất DL-metionyl-DL-metionin (I) có công thức:



(I)

bao gồm bước cho dẫn xuất ure có công thức chung II:



(II)

trong đó các gốc R^1 và R^2 trong dẫn xuất ure IIa, IIb, IIc, IId và IIe được xác định như sau:

trong đó: IIa: $R^1 = \text{COOH}$, $R^2 = \text{NHCONH}_2$

IIb: $R^1 = \text{CONH}_2$, $R^2 = \text{NHCONH}_2$

IIc: $R^1 = \text{CONH}_2$, $R^2 = \text{NH}_2$

IId: $R^1 = \text{CN}$, $R^2 = \text{OH}$

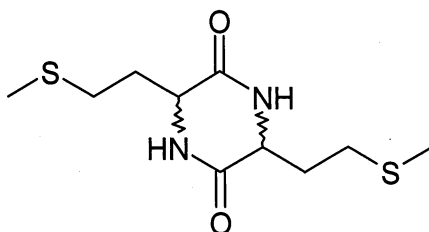
IIe: $R^1 = \text{CN}$, $R^2 = \text{NH}_2$

phản ứng để tạo ra DL-metionyl-DL-metionin.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó độ pH của dung dịch chứa dẫn xuất ure được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 8 đến 14.

3. Quy trình theo điểm 2, trong đó độ pH được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 10 đến 13.
4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó phản ứng này xảy ra ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50 đến 200°C.
5. Quy trình theo điểm 4, trong đó phản ứng xảy ra ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80 đến 170°C.
6. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó phản ứng này được thực hiện ở điều kiện áp suất.
7. Quy trình theo điểm 6, trong đó phản ứng này được thực hiện ở điều kiện áp suất từ 3 đến 20 bar (300 kPa đến 2000 kPa).
8. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này bao gồm các bước sau đây:

a) cho dẫn xuất ure có công thức IIa, IIb, IIc, IId và IIe phản ứng để tạo ra điketopiperazin (III) có công thức:



(III)

b) cho điketopiperazin (III) phản ứng để tạo ra DL-metionyl-DL-metionin (I), trong đó phản ứng của dẫn xuất ure để tạo ra điketopiperazin được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 200°C.

9. Quy trình theo điểm 8, trong đó phản ứng của dẫn xuất ure để tạo ra điketopiperazin được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 180°C.

10. Quy trình theo điểm 8 hoặc 9, trong đó phản ứng của dẫn xuất ure để tạo ra diketopiperazin được thực hiện ở điều kiện áp suất.
11. Quy trình theo điểm 10, trong đó phản ứng của dẫn xuất ure để tạo ra diketopiperazin được thực hiện ở điều kiện áp suất từ 3 đến 20 bar (300 kPa đến 2000 kPa).
12. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 11, trong đó phản ứng của dẫn xuất ure để tạo ra diketopiperazin xảy ra với sự có mặt của bazơ.
13. Quy trình theo điểm 12, trong đó bazơ này được chọn từ nhóm gồm các bazơ chứa nitơ, NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, KHCO_3 , K_2CO_3 , hỗn hợp $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CO}_2$, các muối carbamat, bazơ của kim loại kiềm và kim loại kiềm thổ.
14. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 13, trong đó phản ứng của dẫn xuất ure để tạo ra diketopiperazin xảy ra bằng cách cho phản ứng với metionin.
15. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 14, trong đó phản ứng của diketopiperazin để tạo ra DL-metionyl-DL-metionin xảy ra bằng cách thủy phân bằng axit.
16. Quy trình theo điểm 15, trong đó quá trình thủy phân bằng axit xảy ra với sự có mặt của axit được chọn từ nhóm gồm các axit vô cơ, HCl , H_2CO_3 , $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , axit phosphoric, axit carboxylic và axit hydroxy carboxylic.
17. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 16, trong đó phản ứng của diketopiperazin để tạo ra DL-metionyl-DL-metionin xảy ra bằng cách thủy phân bằng kiềm.
18. Quy trình theo điểm 17, trong đó phản ứng thủy phân bằng kiềm này được thực hiện ở độ pH từ 7 đến 14 để thu được DL-metionyl-DL-metionin.

19. Quy trình theo điểm 18, trong đó phản ứng thủy phân bằng kiềm này được thực hiện ở độ pH từ 9 đến 12.
20. Quy trình theo điểm 17 đến 19, trong đó điều kiện kiềm được điều chỉnh bằng cách sử dụng một chất được chọn từ nhóm gồm các bazơ chứa nitơ, NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, hỗn hợp $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CO}_2$, các muối carbamat, KHCO_3 , K_2CO_3 , cacbonat, các bazơ kim loại kiềm và các bazơ kim loại kiềm thổ.
21. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 20, trong đó phản ứng này được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 200°C .
22. Quy trình theo điểm 21, trong đó phản ứng này được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 80°C đến 180°C .
23. Quy trình theo điểm 22, trong đó phản ứng này được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 90°C đến 160°C .
24. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 14, trong đó phản ứng của diketopiperazin để tạo ra DL-metionyl-DL-metionin xảy ra bằng cách đưa CO_2 vào dung dịch kiềm.
25. Quy trình theo điểm 24, trong đó dung dịch kiềm là dung dịch amoni hydroxit, kali hydroxit hoặc natri hydroxit có tính kiềm.
26. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 25, trong đó diketopiperazin được tách ra trước khi thủy phân.
27. Quy trình theo điểm 26, trong đó diketopiperazin được tách ra bằng cách kết tinh từ dung dịch phản ứng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -30 đến 120°C .
28. Quy trình theo điểm 27, trong đó quá trình kết tinh được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 70°C .

29. Quy trình phân tách hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang DD/LL/DL/LD-metionylmetionin bằng cách kết tinh từ dung dịch phản ứng kiềm đã thu được theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14 và 17 đến 28.
30. Quy trình theo điểm 29, trong đó dung dịch này được điều chỉnh đến độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 9.
31. Quy trình theo điểm 30, trong đó dung dịch được điều chỉnh đến độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 7.
32. Quy trình theo điểm 31, trong đó dung dịch này được điều chỉnh đến độ pH khoảng 5,6.
33. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 29 đến 32, trong đó quá trình kết tinh xảy ra với sự có mặt của axit được chọn từ nhóm gồm các axit vô cơ, HCl, H_2CO_3 , $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , axit phosphoric, axit carboxylic, axit hydroxy carboxylic.
34. Quy trình phân tách hỗn hợp các chất đồng phân không đối quang DD/LL/DL/LD-metionylmetionin bằng cách kết tinh từ dung dịch phản ứng có tính axit thu được theo điểm 15 hoặc 16, trong đó dung dịch này được điều chỉnh đến độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 9.
35. Quy trình theo điểm 34, trong đó dung dịch này được điều chỉnh bằng bazơ đến độ pH nằm trong khoảng từ 5 đến 7.
36. Quy trình theo điểm 35, trong đó dung dịch này được điều chỉnh đến độ pH khoảng 5,6.
37. Quy trình theo điểm bất kỳ từ 34 đến 36, trong đó bazơ này được chọn từ nhóm gồm NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, các bazơ chứa nitơ, NH_4OH , các muối carbamat, KHCO_3 , K_2CO_3 , cacbonat, bazơ của kim loại kiềm và kim loại kiềm thổ.

Đồ thị thể hiện sự phân cắt bằng enzym của các hỗn hợp chất đồng phân không đối quang metionylmetionin DD/LL-I, DL/LD-I và DD/LL/DL/LD-I

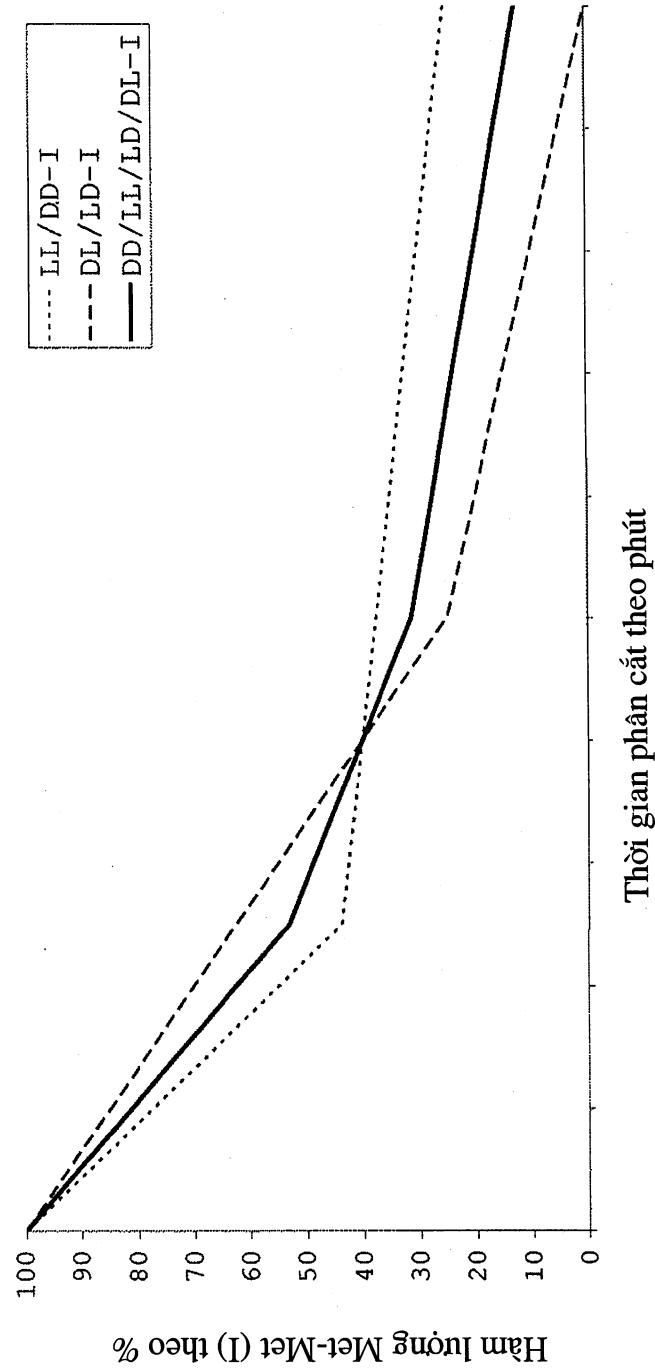


Fig. 1

Đồ thị thể hiện sự phân cắt bằng enzym bốn chất đồng phân không
đối quang metionylmetionin DD-I, LL-I, DL-I và LD-I với mức độ
phân cắt khác nhau

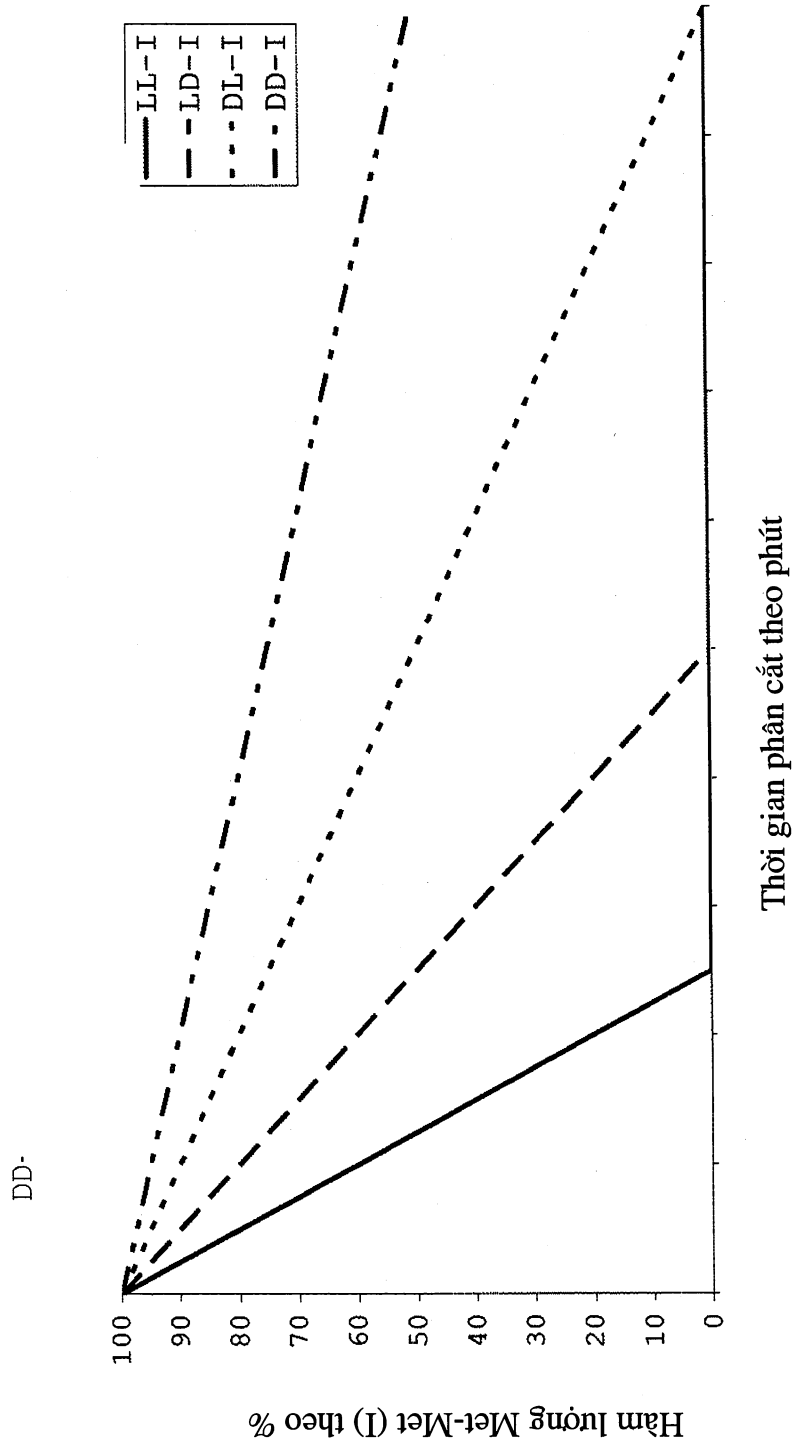


Fig. 2

Đồ thị thể hiện sự giải phóng metionin (D- cùng với L-Met) bằng enzym từ bốn chất đồng phân không đối quang metionylmetionin DD-I, LL-I, DL-I và LD-I

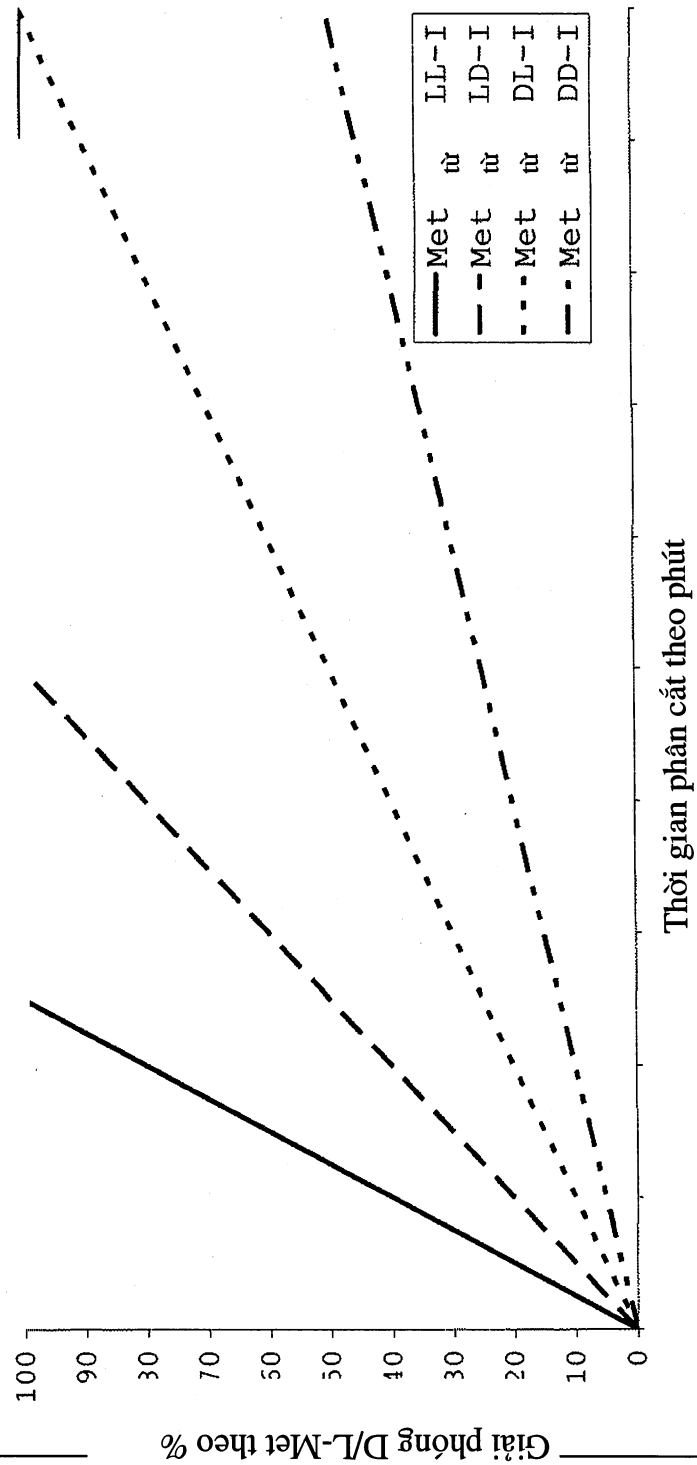


Fig. 3

Đặc tính ngấm chiết của các hỗn hợp chất đồng phân không đối quang metionylmetionin DD/LL-I, DL/LD-I và LL/DD/LD/DL-I so với metionin, MHA và MHA-Ca

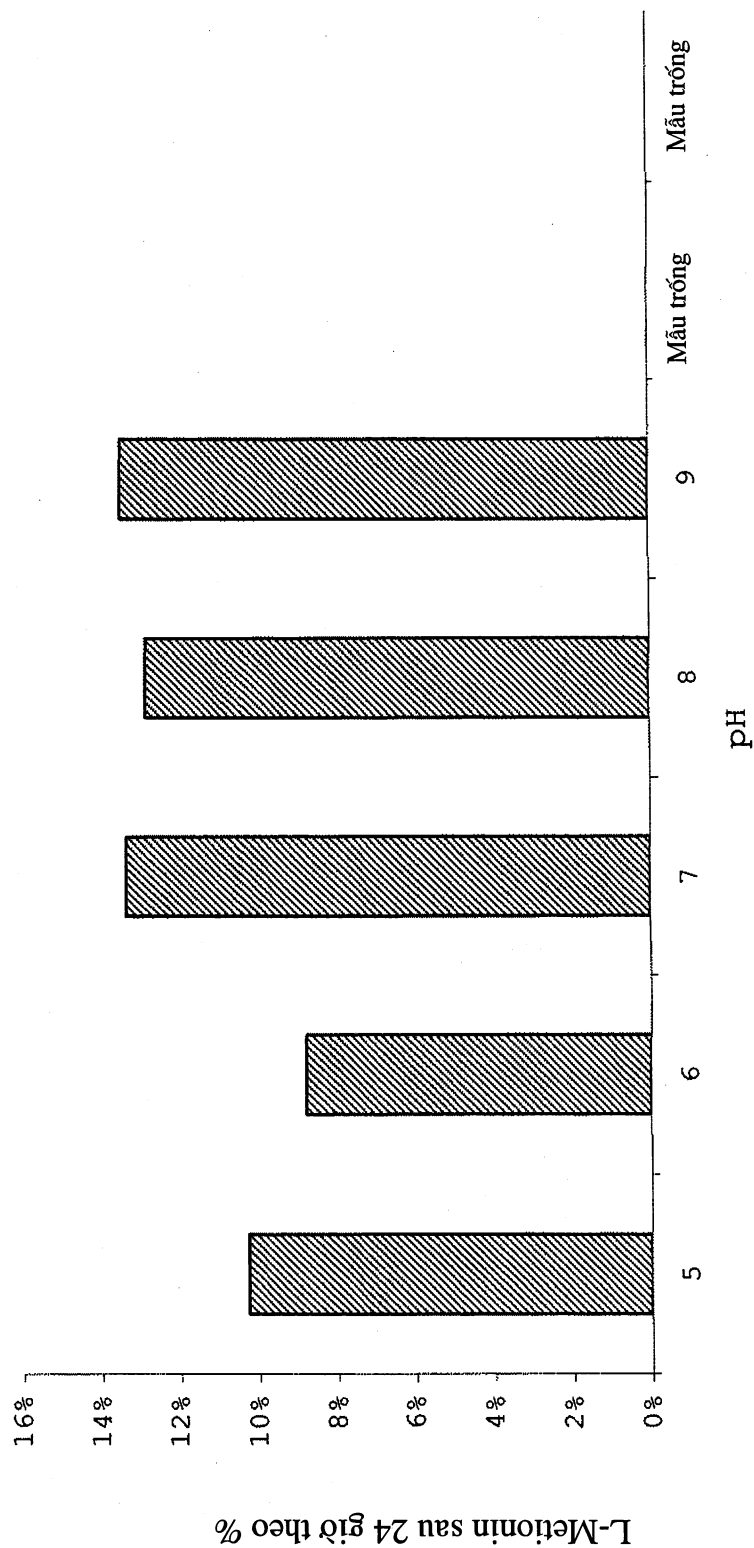


Fig. 4

Các đặc tính ngâm chiết của các hỗn hợp chất đồng phân không đối quang metionylmetionin DD/LL-I, DL/LD-I và LL/DD/LD/DL-I so với metionin, MHA và MHA-Ca

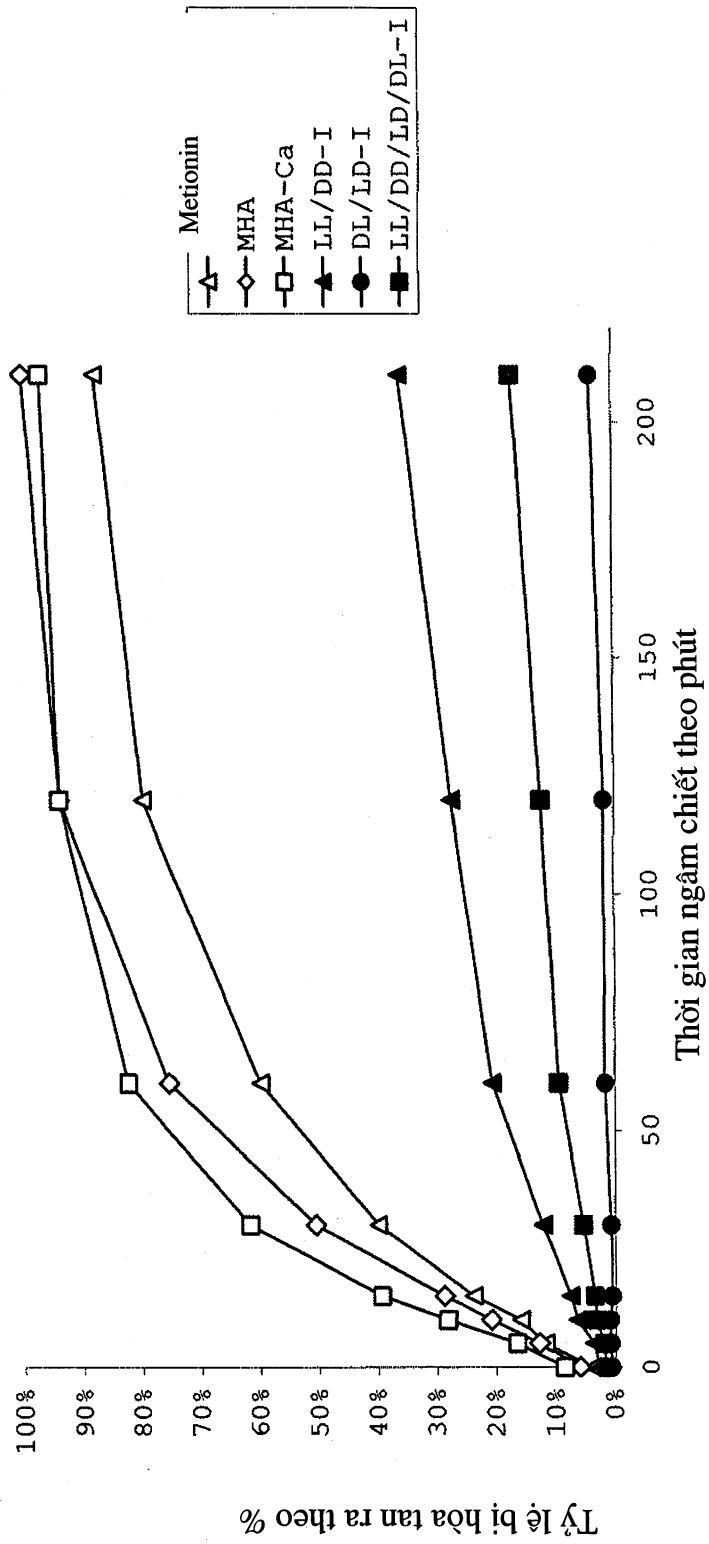


Fig. 5

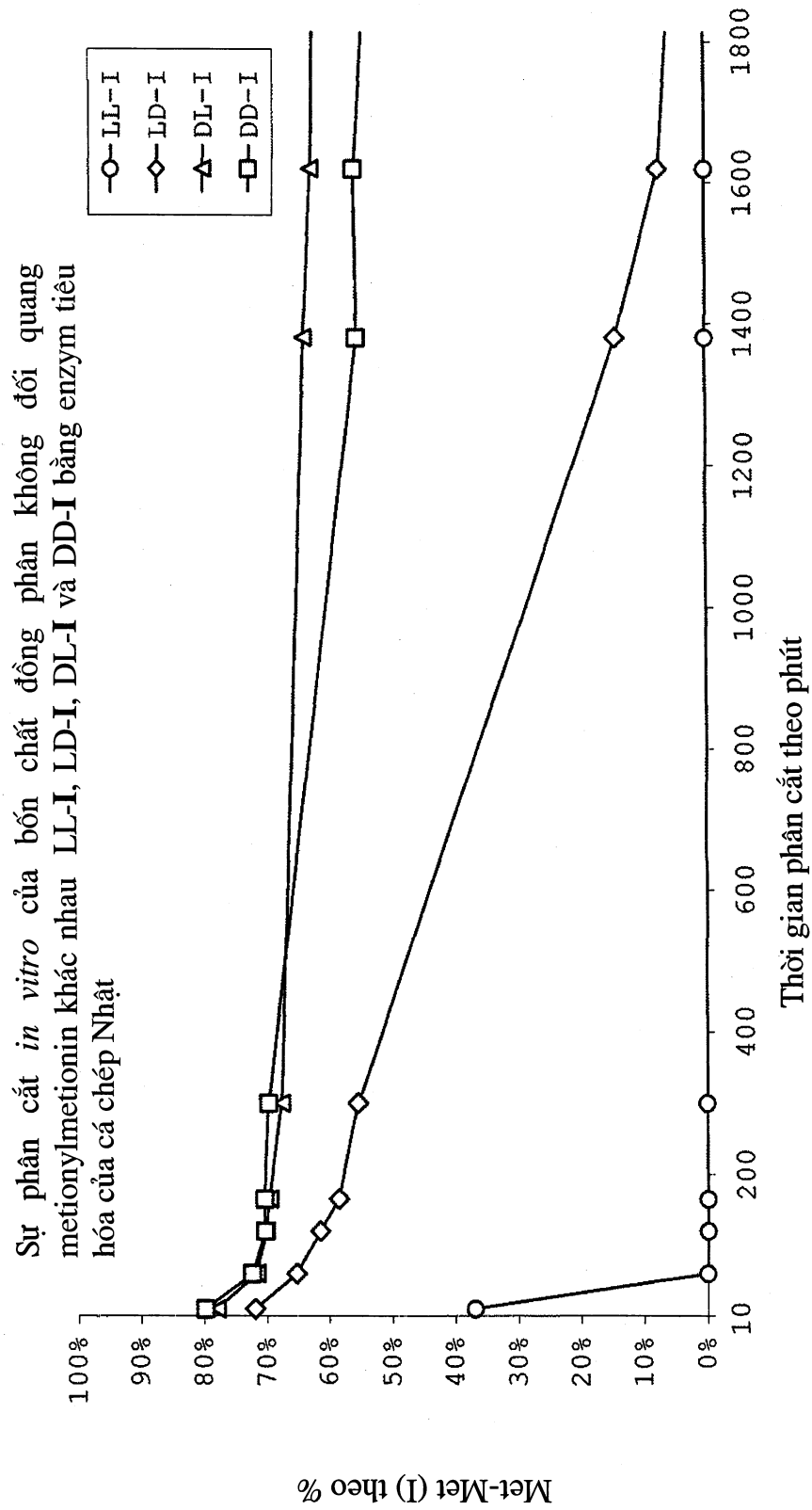


Fig. 6

Sự phân cắt *in vitro* của hỗn hợp chất đồng phân không đối quang metionylmetionin khác nhau LL/DD-I, DL/LD-I và LL/DD/LD/DL-I bằng enzym tiêu hóa của cá chép Nhật

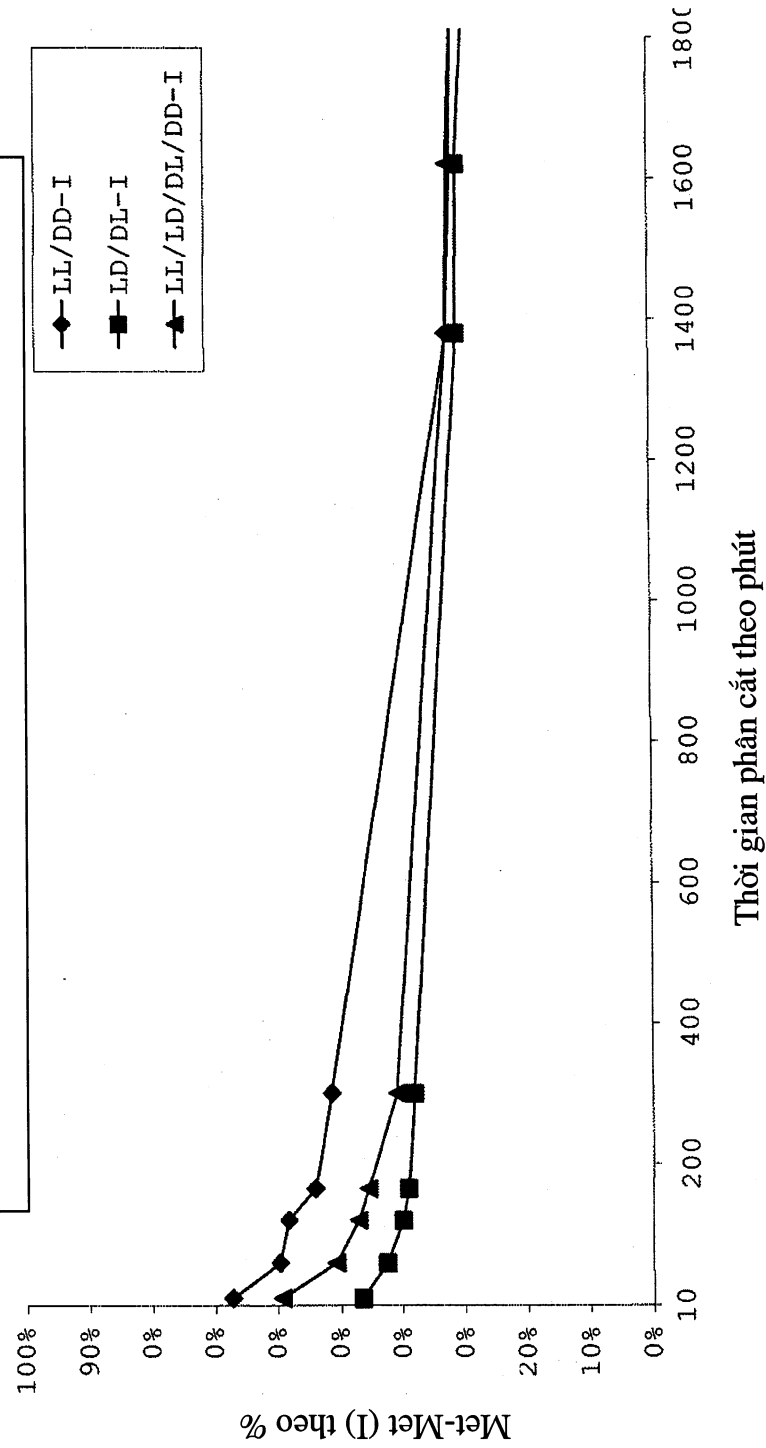


Fig. 7

Sự phân cắt *in vitro* của bốn chất đồng phân không đối quang metionylmetionin khác nhau LL-I, LD-I, DL-I và DD-I bằng enzym tiêu hóa của cá hồi vân

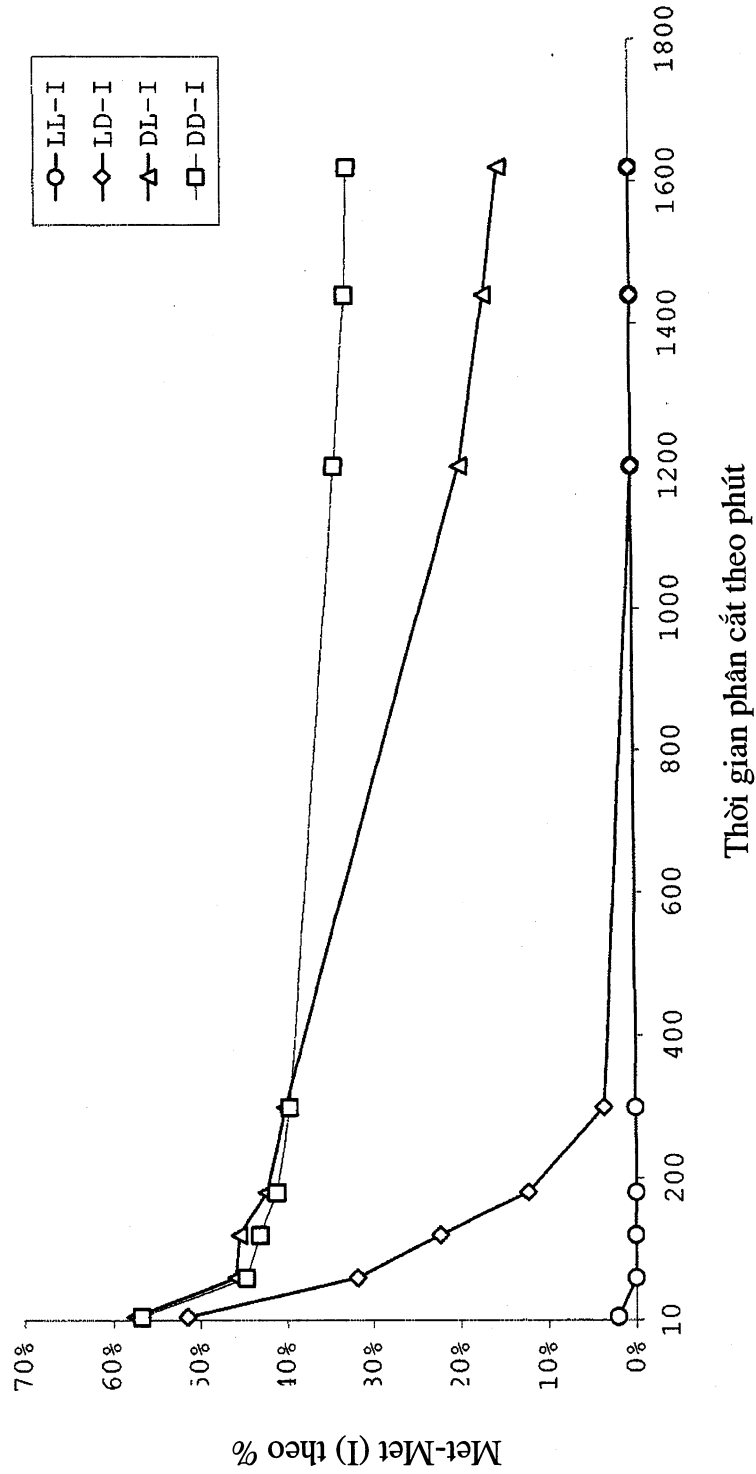


Fig. 8

Sự phân cắt in vitro của các hỗn hợp chất đồng phân không đối quang metionylmetionin LL/DD-I, DL/LD-I và LL/DD/LD/DL-I bằng enzym tiêu hóa của cá hồi vân

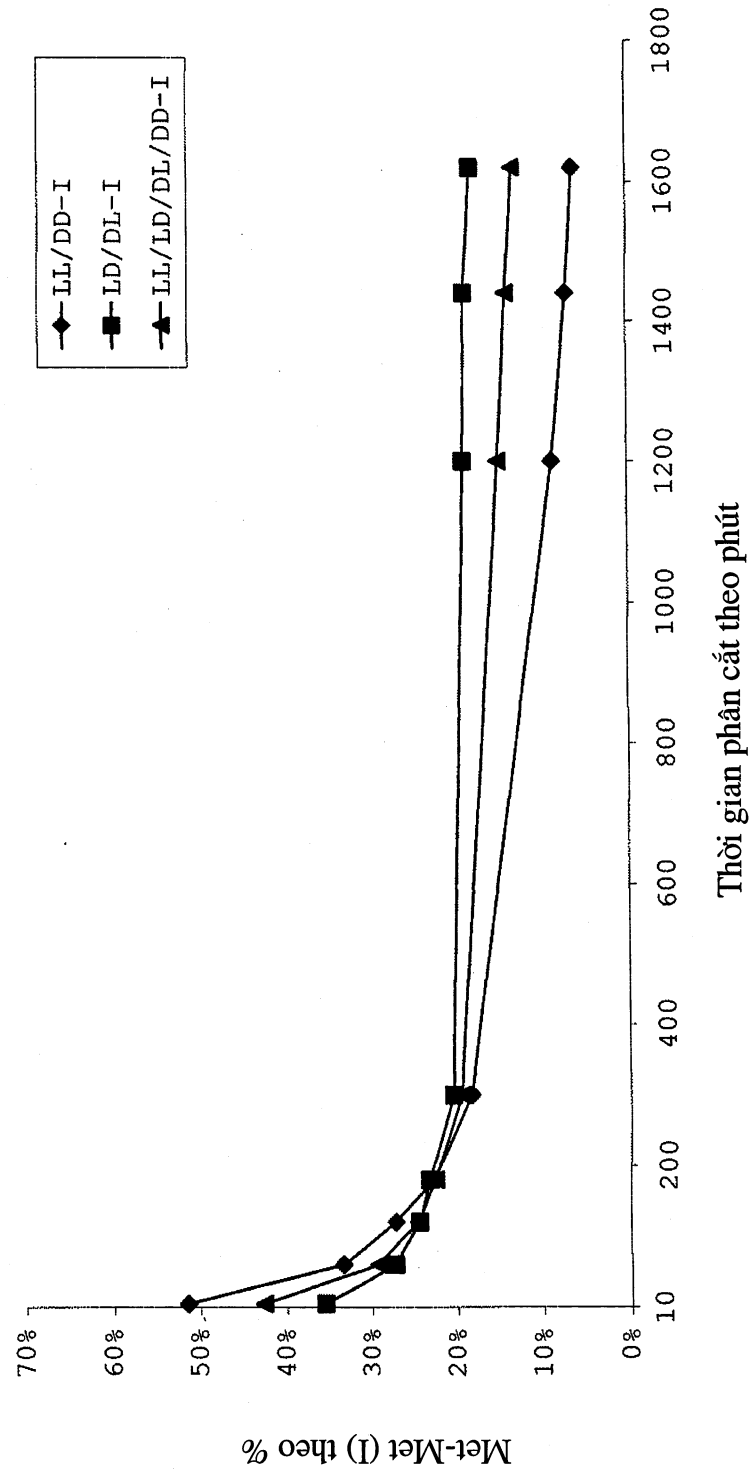


Fig. 9

Sự phân cắt *in vitro* của bốn chất đồng phân không đối quang metionylmetionin khác nhau LL-I, LD-I, DL-I và DD-I bằng enzym tiêu hóa của tôm thẻ chân trắng

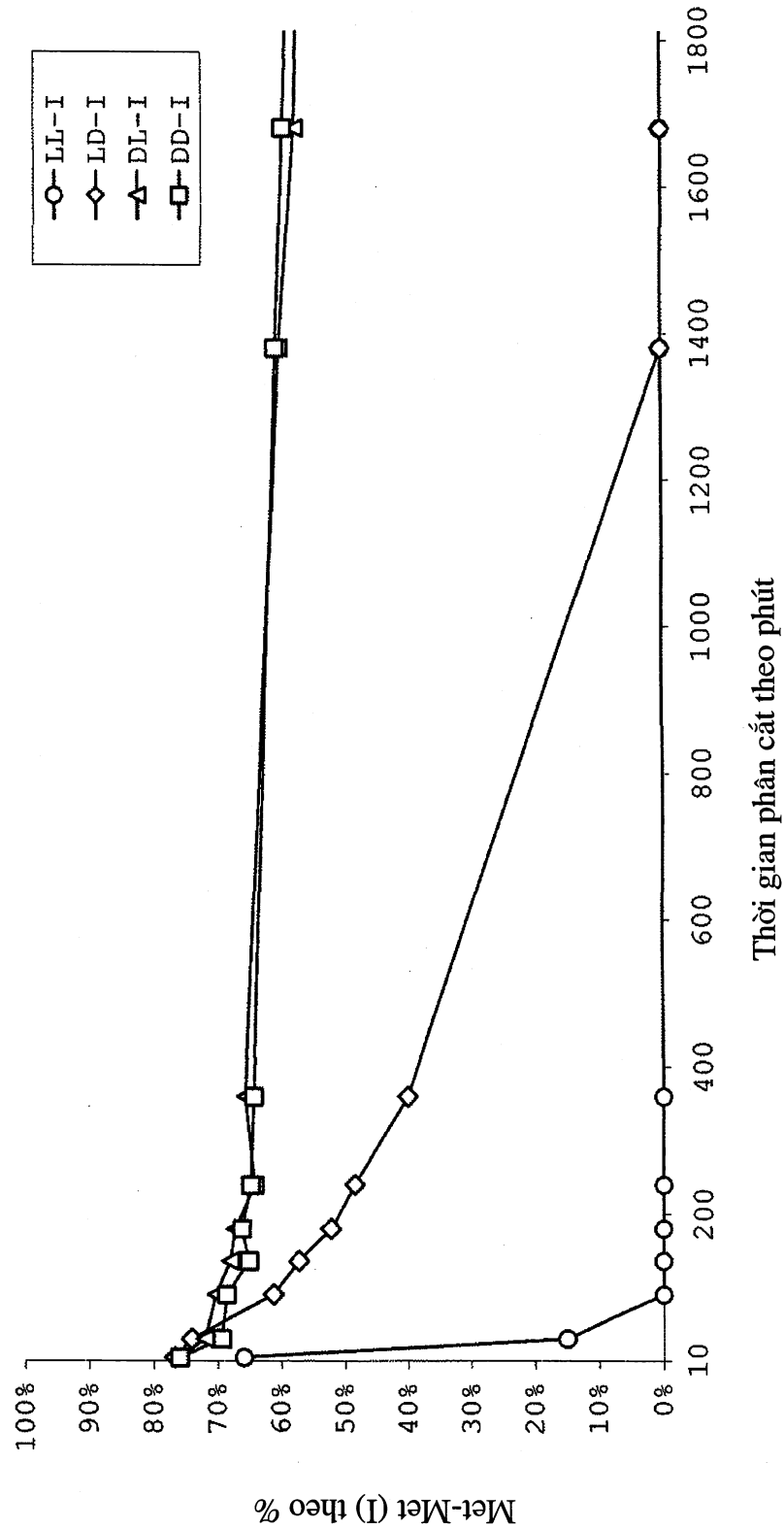


Fig. 10

Sự phân cắt in vitro của các hỗn hợp chất đồng phân không đối quang metionylmetionin khác nhau LL/DD-I, DL/LD-I và LL/DD/LD/LD-I bằng enzyme tiêu hóa của tôm thẻ chân trắng

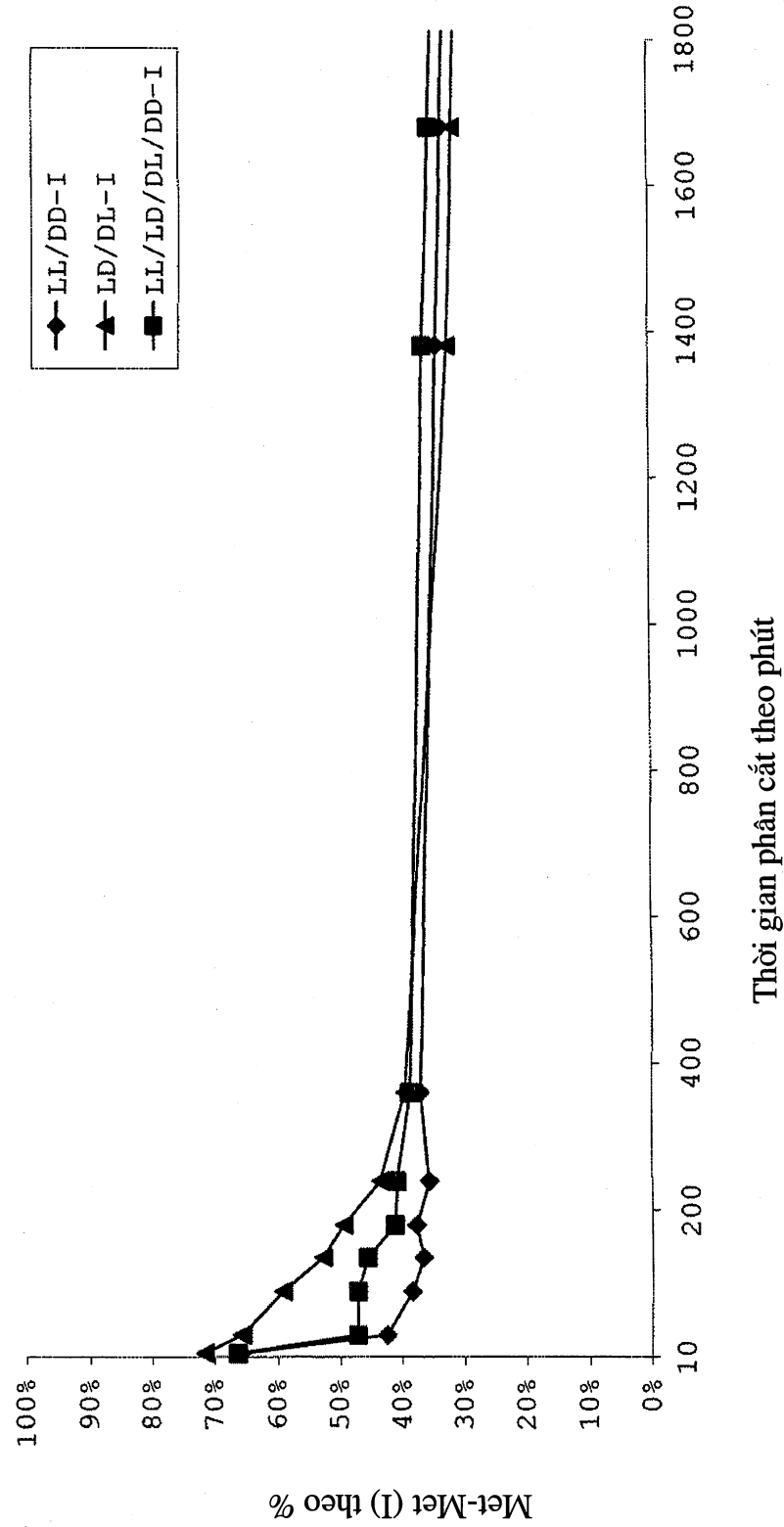


Fig. 11