



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

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

(11)



1-0027719

(51)⁷ A61K 36/16

(13) B

(21) 1-2016-03370

(22) 12/01/2015

(86) PCT/EP2015/050401 12/01/2015

(87) WO 2015/117793 13/08/2015

(30) 10 2014 202 318.1 10/02/2014 DE

(45) 25/03/2021 396

(43) 25/11/2016 344A

(73) DR. WILLMAR SCHWABE GMBH & CO. KG (DE)

Willmar-Schwabe-Str. 4, 76227 Karlsruhe, Germany

(72) WAIMER, Frank (DE); REINHARD, Steffen (DE); HAUER, Hermann (DE).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM CHIẾT KHÔ TỪ LÁ CÂY BẠCH QUẢ

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp gồm nhiều bước dùng để sản xuất sản phẩm chiết từ lá cây bạch quả để sử dụng làm thuốc.

Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến phương pháp cải tiến gồm nhiều bước dùng để sản xuất sản phẩm chiết từ lá cây bạch quả để sử dụng làm thuốc.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sản phẩm chiết từ lá cây bạch quả được sử dụng làm thuốc trong nhiều thế kỷ. Hiện nay, chúng được sử dụng để điều trị các dạng sa sút trí tuệ khác nhau và các triệu chứng của nó và các dạng rối loạn tuần hoàn não và ngoại vi. Hoạt chất được đề cập đến là terpen lacton (ginkgolit A, B, C và bilobalit) và glycosit của flavon (quercetin, kaempferol và isorhamnetin). Theo dược điển châu Âu hiện nay (version 8.0; monograph 04/2008: 1827 “Ginkgo dry extract, refined and quantified”), điều kiện bắt buộc đối với tất cả sản phẩm chiết từ cây bạch quả mà có thể được chấp thuận làm thuốc trong phạm vi dược điển là sản phẩm chiết từ cây bạch quả chứa 22,0% đến 27,0% flavonoid, được tính dưới dạng flavonglycosit, 2,6% đến 3,2% bilobalit, 2,8% đến 3,4% ginkgolit A, B và C và không nhiều hơn 5 phần triệu (ppm – parts per million) axit ginkgolic. Quy trình chiết để thu sản phẩm này được mô tả trong tài liệu “Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln (Aufbereitungsmonographien für den humanmedizinischen Bereich) – Ginkgo folium (Ginkgo-biloba-Blätter)” (“notification for the approval and registration of drugs (preparation monographs for the human medicine area) – Ginkgo folium (Ginkgo biloba leaves)”) (Bundesanzeiger 46, (133), 7360-7361 (1994)): “A dry extract prepared from the dried leaves of Ginkgo biloba LINNE with acetone-water and subsequent purification steps without the addition of concentrates or isolated ingredients”.

Gần đây thu được ngày càng nhiều lá cây bạch quả có hàm lượng thành phần nhưng khi chiết bằng phương pháp đã biết thì lại không thu được sản phẩm chiết đáp ứng các quy định của dược điển châu Âu. Đặc biệt, hiện nay lá cây bạch

quả có hàm lượng terpen lacton cao bất thường thu hoạch được ngày càng tăng, do đó dẫn đến hàm lượng trong sản phẩm chiết tăng lên. Tuy nhiên, đôi khi lá cây bạch quả còn chứa hàm lượng flavonoid cao bất thường.

Các phương pháp chiết quan trọng nhất để thu được sản phẩm chiết đáp ứng các quy định của dược điển châu Âu khi sử dụng lá cây bạch quả thích hợp, được mô tả trong patent châu Âu số EP 431535 B1 (Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co.) và trong patent châu Âu số EP 360556 B1 (Indena S.p.A.). Gần đây, phương pháp theo patent châu Âu số EP 431536 B1 (Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co.) được đánh giá cao hơn vì phương pháp này không sử dụng các hợp chất gây độc nghiêm trọng như muối chì (EP 431535 B1) hoặc hydrocacbon thơm (EP 360556 B1).

Theo điểm 1 của patent châu Âu số EP 431536 B1, phương pháp dùng để sản xuất sản phẩm chiết từ lá cây bạch quả được đặc trưng ở chỗ:

- (a) lá cây bạch quả tươi hoặc khô được chiết bằng axeton chứa nước, alkanol có 1 đến 3 nguyên tử C chứa nước hoặc metanol khan ở nhiệt độ nằm trong khoảng 40°C đến 100°C,
- (b) lượng lớn dung môi hữu cơ được tách ra khỏi sản phẩm chiết nêu trên đến hàm lượng không lớn hơn 10% trọng lượng, trong đó nước được thêm vào ở các bước chưng cất cuối cùng, nếu cần,
- (c) dung dịch nước cô đặc còn lại được pha loãng với nước đến hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng 5% đến 25% trọng lượng, làm nguội đến nhiệt độ dưới 25°C kèm theo khuấy, để yên cho đến khi hình thành kết tủa, và tách kết tủa tạo thành gồm các thành phần ưa chất béo ít tan trong nước,
- (d) amoni sulfat được thêm vào dung dịch nước còn lại và dung dịch tạo thành được chiết bằng metyl etyl keton hoặc hỗn hợp của metyl etyl keton và axeton,
- (e) cô đặc sản phẩm chiết thu được đến hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng 50% đến 70% và pha loãng sản phẩm cô đặc thu được với nước đến hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng 5% đến 20%,

- (f) chiết dung dịch thu được bằng butanol hoặc pentanol không trộn lẫn với nước trong nhiều bước,
- (g) các pha butanol và pentanol lần lượt được cô đặc đến hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng 50% đến 70%,
- (h) pha loãng sản phẩm cô đặc bằng cách thêm các lượng nước và etanol để thu được dung dịch chứa 5% đến 20% trọng lượng sản phẩm chiết khô trong 20% đến 60% trọng lượng etanol chứa nước,
- (i) dung dịch rượu chứa nước được chiết bằng dung môi béo hoặc dung môi cycloaliphatic có nhiệt độ sôi nằm trong khoảng 60°C đến 100°C trong giai đoạn tách tiếp các hợp chất alkyl phenol,
- (j) pha nước được cô đặc trong áp suất giảm và được làm khô ở nhiệt độ không cao hơn 60°C đến 80°C đến khi chất chiết khô có hàm lượng nước nhỏ hơn 5%.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp cải tiến dùng để sản xuất sản phẩm chiết từ lá cây bạch quả đáp ứng các quy định của dược điển châu Âu ngay cả khi sử dụng lá cây bạch quả có nhiều thành phần không có lợi, cụ thể là có hàm lượng terpen lacton tăng, nhưng cả hàm lượng flavonoid cũng tăng. Hơn nữa, mục đích của sáng chế là thực hiện phương pháp này theo cách không bổ sung các hợp chất tinh khiết hoặc sản phẩm cô đặc gần như tinh khiết do việc bổ sung này là không được phép đối với sản phẩm chiết từ cây bạch quả được sử dụng làm thuốc.

Đã ngạc nhiên phát hiện ra rằng nhờ các bước thực hiện bổ sung cho phương pháp theo patent châu Âu số EP 431 536 B1 cũng từ lá cây bạch quả có nhiều thành phần không có lợi, có thể thu được sản phẩm chiết đáp ứng các tiêu chuẩn trong dược điển châu Âu. Đối với mục đích này, sau khi chiết (phân bố lỏng lỏng) theo bước (d), pha nước được tách khỏi pha metyl etyl keton và metyl etyl keton-axeton, tương ứng, pha metyl etyl keton và metyl etyl keton-axeton, tương ứng, cô đặc đến tỷ lệ sản phẩm chiết khô nằm trong khoảng 40% đến 80%

trọng lượng để thu được sản phẩm cô đặc. Điều chỉnh tỷ lệ 10% đến 60% trọng lượng sản phẩm cô đặc bằng nước và metyl etyl keton đến tỷ lệ sản phẩm chiết khô không nhiều hơn 60% trọng lượng và hàm lượng metyl etyl keton không nhiều hơn 30% trọng lượng, và được chiết bằng hỗn hợp metyl etyl keton và dung môi béo có nhiệt độ sôi nằm trong khoảng 60°C đến 100°C theo tỷ lệ 7/3 đến 9/1 (m/m) thu được pha nước-metyl etyl keton và pha metyl etyl keton-dung môi béo.

Pha nước-metyl etyl keton được kết hợp với 90% đến 40% trọng lượng còn lại của sản phẩm cô đặc để thu được dung dịch và nhờ đó, trung hòa một lượng rất lớn terpen lacton trong thành phẩm.

Theo cách khác, pha metyl etyl keton-dung môi béo có thể được kết hợp với 90% đến 40% trọng lượng sản phẩm cô đặc còn lại để trung hòa lượng rất lớn flavonoit trong thành phẩm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Do đó, phương pháp theo sáng chế dùng để sản xuất sản phẩm chiết khô từ lá cây bạch quả có hàm lượng nằm trong khoảng 22,0% đến 27,0% trọng lượng flavonoit, được tính dưới dạng flavon glycosit, 2,6% đến 3,2% trọng lượng bilobalit, 2,8% đến 3,4% trọng lượng ginkgolit A, B và C và không nhiều hơn 5 ppm axit ginkgolic, phương pháp này bao gồm các bước sau:

- (a) chiết lá cây bạch quả tươi hoặc khô bằng axeton chứa nước, alkanol có 1 đến 3 nguyên tử C chứa nước hoặc metanol khan ở nhiệt độ nằm trong khoảng 40°C đến 100°C thu được dung dịch chiết thô,
- (b) tách bằng cách chưng cất lượng lớn axeton hoặc alkanol có 1 đến 3 nguyên tử C từ dung dịch chiết thô ở bước (a) đến hàm lượng không nhiều hơn 10% trọng lượng, trong đó, nếu metanol khan được sử dụng ở bước (a), thì nước được thêm vào ở các bước chưng cất cuối cùng để thu được dung dịch nước cô đặc,
- (c) pha loãng dung dịch nước cô đặc ở bước (b) bằng nước đến hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng 5% đến 25% trọng lượng, làm nguội đến nhiệt độ dưới

25°C, giữ nguyên cho đến khi hình thành kết tủa và tách kết tủa tạo ra để một lần nữa thu được dung dịch nước,

(d) thêm amoni sulfat vào dung dịch nước thu được ở bước (c) và sản phẩm chiết của dung dịch tạo ra chứa amoni sulfat với metyl etyl keton hoặc hỗn hợp của metyl etyl keton và axeton, tách pha chứa nước ra khỏi pha metyl etyl keton hoặc metyl etyl keton-axeton để thu được pha metyl etyl keton hoặc metyl etyl keton-axeton,

(e) cô đặc pha metyl etyl keton hoặc metyl etyl keton-axeton ở bước (d) đến tỷ lệ sản phẩm chiết khô nằm trong khoảng 40% đến 80% trọng lượng để thu được sản phẩm cô đặc,

(f) điều chỉnh tỷ lệ 10% đến 60% trọng lượng sản phẩm cô đặc ở bước (e) bằng nước và metyl etyl keton đến tỷ lệ sản phẩm chiết khô không nhiều hơn 60% trọng lượng và hàm lượng metyl etyl keton không nhiều hơn 30% trọng lượng để thu được dung dịch chiết đã điều chỉnh và sản phẩm chiết của dung dịch chiết được điều chỉnh thu được bằng hỗn hợp metyl etyl keton và dung môi béo có nhiệt độ sôi nằm trong khoảng 60°C đến 100°C theo tỷ lệ 7/3 đến 9/1 (m/m) thu được pha nước-metyl etyl keton và pha metyl etyl keton-dung môi béo,

(g) kết hợp tỷ lệ 90% đến 40% trọng lượng sản phẩm cô đặc còn lại ở bước (e) với pha nước-metyl etyl keton ở bước (f) hoặc pha metyl etyl keton-dung môi béo ở bước (f) thu được dung dịch,

(h) cô đặc dung dịch ở bước (g) đến hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng 50% đến 70% trọng lượng và pha loãng sản phẩm cô đặc thu được bằng nước đến hàm lượng chất rắn không nhiều hơn 50% trọng lượng để thu được dung dịch,

(i) chiết nhiều bước dung dịch thu được ở bước (h) bằng butanol hoặc pentanol không trộn lẫn với nước để thu được pha butanol hoặc pentanol,

(j) cô đặc pha butanol hoặc pentanol ở bước (i) đến hàm lượng chất rắn bằng ít nhất là 50% trọng lượng để thu được sản phẩm cô đặc,

(k) pha loãng sản phẩm cô đặc thu được ở bước (j) bằng cách thêm lượng nước và etanol, nếu cần, thu được dung dịch có 5% đến 20% trọng lượng sản phẩm chiết khô trong nước và không nhiều hơn 60% trọng lượng etanol trong nước,

(l) chiết dung dịch nước hoặc etanolic chứa nước ở bước (k) bằng dung môi béo có nhiệt độ sôi nằm trong khoảng 60°C đến 100°C, tách pha chứa nước ra khỏi pha dung môi béo để thu được pha nước,

(m) cô đặc pha nước thu được ở bước (l) trong áp suất giảm và ở nhiệt độ không cao hơn 60°C đến 80°C thu được sản phẩm chiết khô có hàm lượng nước nhỏ hơn 5% trọng lượng.

Theo các phương án được ưu tiên của sáng chế,

- đối với dung môi chiết ở bước (a), sử dụng axeton chứa nước có hàm lượng axeton nằm trong khoảng 50% đến 70% trọng lượng, đặc biệt được ưu tiên là có hàm lượng axeton nằm trong khoảng 60% trọng lượng,
- đối với dung môi chiết ở bước (a), sử dụng alkanol chứa nước, được chọn từ metanol, etanol, 1-propanol và 2-propanol, có hàm lượng alkanol nằm trong khoảng 50% đến 70% trọng lượng, đặc biệt được ưu tiên là etanol chứa nước có hàm lượng etanol khoảng 60% trọng lượng,
- ở bước (c), dung dịch hoạt tính pha loãng được làm lạnh đến nhiệt độ dưới 12°C,
- ở bước (d), bổ sung ít nhất 30% trọng lượng amoni sulfat, đặc biệt được ưu tiên là 30% đến 50% trọng lượng amoni sulfat, so với dung dịch nước ở bước (c),
- ở bước (d), dung dịch được chiết bằng hỗn hợp metyl etyl keton và axeton theo tỷ lệ 7/3 đến 3/4 (m/m),
- ở bước (i), dung dịch được chiết bằng 1-butanol và/hoặc

- ở bước (l), dung dịch được chiết bằng heptan, đặc biệt được ưu tiên là n-heptan hoặc hỗn hợp của chất đồng phân heptan có tỷ lệ n-heptan nhiều hơn 35% trọng lượng.

Ngoài ra, tương tự với các patent châu Âu số EP 1868625 B1 và EP 1868568 B1, các bước của phương pháp bổ sung sau đây có thể được thực hiện để loại bỏ 4'-O-methylpyridoxin:

- (n) điều chế dung dịch etanolic chứa nước dùng để chiết lá cây bạch quả có hàm lượng ethanol nằm trong khoảng 40% đến 60% trọng lượng từ pha nước ở bước (k) hoặc từ sản phẩm chiết khô ở bước (m),
- (o) đưa dung dịch etanolic chứa nước dùng để chiết lá cây bạch quả ở bước (n) lên chất trao đổi ion axit mạnh để loại bỏ 4'-O-methyl pyridoxin còn lại trong chất trao đổi ion và rửa giải sử dụng ethanol chứa nước để thu được dung dịch chiết không chứa 4'-O-methyl pyridoxin làm dung dịch rửa giải,
- (p) cô đặc dung dịch rửa giải ở bước (o) trong áp suất giảm và làm khô ở nhiệt độ không cao hơn 60°C đến 80°C thành sản phẩm chiết khô có hàm lượng nước ít hơn 5% trọng lượng.

Ví dụ về các chất trao đổi ion axit mạnh là Merck I và Amberlite IR-120. Thông thường, chất trao đổi ion axit mạnh là nhựa polystyren liên kết với nhóm axit sulfonic.

Một số định nghĩa về các thuật ngữ được sử dụng kết hợp với phương pháp theo sáng chế được nêu dưới đây:

sản phẩm chiết khô: nói chung, sản phẩm chiết khô có hàm lượng nước không nhiều hơn 5% trọng lượng theo dược điển châu Âu.

Thuật ngữ khan theo sáng chế, ví dụ, liên quan đến metanol khan ở bước (a), đề cập đến hàm lượng nước $\leq 1\%$ trọng lượng nước.

Quy trình chiết bao gồm một bước, nhiều bước và chiết liên tục.

Các dung môi béo có nhiệt độ sôi nằm trong khoảng 60°C đến 100°C tốt hơn là n-heptan hoặc hỗn hợp của hydrocacbon béo no không vòng và/hoặc có vòng được xác định bằng nhiệt độ sôi của chúng và đã biết và có bán ngoài thị trường dưới dạng ete dầu mỏ hoặc nhiên liệu dầu mỏ. Tốt hơn là, hỗn hợp của các hydrocacbon béo được sử dụng, chủ yếu bao gồm n-heptan và các C7 alkan khác. Phần lớn n-heptan có nhiều hơn 35% trọng lượng n-heptan (nhiệt độ sôi 98°C) được tìm thấy ở phân đoạn 94°C-100°C.

Butanol hoặc pentanol không trộn lẫn với nước như nêu ở bước (i) tốt hơn là 1-butanol hoặc 1-pentanol.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phương pháp theo sáng chế được giải thích và mô tả tiếp dưới đây nhờ Ví dụ so sánh 1 theo EP 431 536 B1 và Ví dụ 1 theo sáng chế.

Dung dịch ban đầu của Ví dụ 1 và Ví dụ so sánh 1

(theo các bước từ (a) đến (d) của phương pháp theo EP 431 536 B1 và phương pháp theo sáng chế)

Trong các ví dụ dưới đây, thuật ngữ “heptan” nghĩa là hỗn hợp của hydrocacbon béo no có khoảng nhiệt độ sôi 94°C-100°C và tỷ lệ n-heptan nhiều hơn 35% trọng lượng.

500 g lá cây bạch quả khô và vụn được chiết bằng 3,75 kg 60% trọng lượng axeton trong 30 phút ở nhiệt độ 60°C. Nguyên liệu thực vật được lọc, chiết lại bằng 3,75 kg 60% trọng lượng axeton trong 30 phút ở nhiệt độ 60°C và lọc lại. Gộp hai dung dịch chiết thu được và cô đặc (438 g; sản phẩm chiết khô 36,9%).

Pha loãng sản phẩm cô đặc thu được bằng 400 g nước và khuấy trong 1 giờ ở nhiệt độ 12°C. Lọc kết tủa tạo ra và thêm 240 g amoni sulfat vào phần lọc và hòa tan. Chiết dung dịch này hai lần, mỗi lần bằng 400 ml metyl etyl keton/axeton 6/5 (m/m). Gộp các pha metyl etyl keton/axeton (808 g).

Ví dụ so sánh 1 theo EP 431536 B1

(theo các bước từ (e) đến (j) của phương pháp theo EP 431536 B1)

Một nửa dung dịch ban đầu nêu trên (404 g) được cô đặc (27,2 g); sản phẩm chiết khô (50%). Pha loãng sản phẩm cô đặc này bằng 107,8 g nước (sản phẩm chiết khô 10%) và chiết bằng cách lắc ba lần mỗi lần bằng 65 ml 1-butanol bão hòa với nước. Gom các pha 1-butanol, cô đặc và làm khô trong chân không trong 16 giờ ở nhiệt độ 50°C (6,72 g).

Hòa tan sản phẩm chiết khô thu được trong hỗn hợp gồm 20,2 g etanol và 40,3 g nước (sản phẩm chiết khô 10%). Chiết dung dịch này bằng cách lắc ba lần mỗi lần bằng 20 ml heptan, cô đặc và làm khô trong chân không trong 16 giờ ở nhiệt độ 50°C: 6,11 g (2,4% đối với thuốc).

	Tìm thấy trong thực tế	Dược điển châu Âu
Flavonoit	23,62%	22,0-27,0%
Bilobalit	5,48%	2,6-3,2%
Ginkgolit A, B và C	5,29%	2,8-3,4%
Axit ginkgolic	< 5 ppm	tối đa, 5 ppm

Sản phẩm chiết thu được không đáp ứng các quy định của dược điển châu Âu về hàm lượng bilobalit và ginkgolit A, B và C.

Ví dụ 1 theo sáng chế

(theo các bước từ (e) đến (m) của phương pháp theo sáng chế)

Nửa thứ hai của dung dịch ban đầu nêu trên (404 g) được cô đặc (20,5 g; một phần sản phẩm chiết khô 68,2%). 10,75 g sản phẩm cô đặc này được điều chỉnh bằng 8,1 g nước và 5,6 g metyl etyl keton đến một phần sản phẩm chiết khô 30% và hàm lượng metyl etyl keton 23% trọng lượng, và được chiết bằng cách lắc hai lần mỗi lần bằng 18,3 g metyl etyl keton/heptan 8/2 (m/m).

Pha nước-metyl etyl keton được kết hợp với sản phẩm cô đặc còn lại của dung dịch ban đầu (9,75 g). Dung dịch được cô đặc đến 24,17 g, được điều chỉnh

bằng 115,5 g nước đến một phần sản phẩm chiết khô 10% và chiết bằng cách lắc ba lần mỗi lần bằng 65 ml 1-butanol bão hòa với nước. Gôm các pha 1-butanol, cô đặc và làm khô trong chân không trong 16 giờ ở nhiệt độ 50°C (5,93 g).

Hòa tan sản phẩm chiết khô thu được trong hỗn hợp gồm 17,8 g etanol và 35,6 g nước (một phần sản phẩm chiết khô 10%). Chiết dung dịch này bằng cách lắc ba lần mỗi lần bằng 20 ml heptan, cô đặc và làm khô trong chân không trong 16 giờ ở nhiệt độ 50°C: 5,29 g (2,1% đối với thuốc).

	Tìm thấy trong thực tế	Dược điển châu Âu
Flavonoit	25,95%	22,0-27,0%
Bilobalit	3,01%	2,6-3,2%
Ginkgolit A, B và C	3,06%	2,8-3,4%
Axit ginkgolic	< 5 ppm	tối đa, 5 ppm

Sản phẩm chiết thu được cần đáp ứng các quy định của dược điển châu Âu liên quan đến tất cả các thành phần, đặc biệt là các thành phần bilobalit và ginkgolit A, B và C.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất sản phẩm chiết khô từ lá cây bạch quả có hàm lượng từ 22,0% đến 27,0% trọng lượng flavonoid, được tính dưới dạng flavon glycosit, 2,6% đến 3,2% trọng lượng bilobalit, 2,8% đến 3,4% trọng lượng ginkgolit A, B và C và không nhiều hơn 5 ppm axit ginkgolic, phương pháp này bao gồm các bước sau:

(a) chiết lá cây bạch quả tươi hoặc khô bằng axeton chứa nước, alkanol có 1 đến 3 nguyên tử C chứa nước hoặc metanol khan ở nhiệt độ nằm trong khoảng 40°C đến 100°C thu được dung dịch chiết thô,

(b) tách bằng cách chưng cất lượng lớn axeton hoặc alkanol có 1 đến 3 nguyên tử C từ dung dịch chiết thô ở bước (a) đến hàm lượng không nhiều hơn 10% trọng lượng, trong đó, nếu metanol khan được sử dụng ở bước (a), thì nước được thêm vào ở các bước chưng cất cuối cùng để thu được dung dịch nước cô đặc,

(c) pha loãng dung dịch nước cô đặc ở bước (b) bằng nước đến hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng 5% đến 25% trọng lượng, làm nguội đến nhiệt độ dưới 25°C, giữ nguyên cho đến khi tạo ra kết tủa và tách kết tủa tạo ra để một lần nữa thu được dung dịch nước,

(d) thêm amoni sulfat vào dung dịch nước thu được ở bước (c) và chiết dung dịch thu được chứa amoni sulfat bằng metyl etyl keton hoặc hỗn hợp của metyl etyl keton và axeton, tách pha chứa nước ra khỏi pha metyl etyl keton hoặc metyl etyl keton-axeton thu được pha metyl etyl keton hoặc metyl etyl keton-axeton,

(e) cô đặc pha metyl etyl keton hoặc metyl etyl keton-axeton ở bước (d) đến tỷ lệ sản phẩm chiết khô nằm trong khoảng 40% đến 80% trọng lượng để thu được sản phẩm cô đặc,

(f) điều chỉnh tỷ lệ 10% đến 60% trọng lượng của sản phẩm cô đặc ở bước (e) bằng nước và metyl etyl keton đến tỷ lệ sản phẩm chiết khô không nhiều hơn 60% trọng lượng và hàm lượng metyl etyl keton không nhiều hơn 30% trọng lượng để thu được dung dịch chiết đã điều chỉnh và chiết dung dịch chiết đã điều

chỉnh thu được này bằng hỗn hợp metyl etyl keton và dung môi béo có nhiệt độ sôi nằm trong khoảng 60°C đến 100°C theo tỷ lệ 7/3 đến 9/1 (m/m) để thu được pha nước-metyl etyl keton và pha metyl etyl keton-dung môi béo,

(g) kết hợp tỷ lệ sản phẩm cô đặc còn lại từ 90% đến 40% trọng lượng ở bước (e) với pha nước-metyl etyl keton ở bước (f) hoặc pha metyl etyl keton-dung môi béo ở bước (f) để thu được dung dịch,

(h) cô đặc dung dịch ở bước (g) đến hàm lượng chất rắn nằm trong khoảng 50% đến 70% trọng lượng và pha loãng sản phẩm cô đặc thu được bằng nước đến hàm lượng chất rắn không lớn hơn 50% trọng lượng để thu được dung dịch,

(i) chiết nhiều bước dung dịch thu được ở bước (h) bằng butanol hoặc pentanol không trộn lẫn với nước để thu được pha butanol hoặc pentanol,

(j) cô đặc pha butanol hoặc pentanol ở bước (i) đến hàm lượng chất rắn bằng ít nhất là 50% trọng lượng để thu được sản phẩm cô đặc,

(k) pha loãng sản phẩm cô đặc thu được ở bước (j) bằng cách thêm lượng nước và etanol, nếu cần, thu được dung dịch có 5% đến 20% trọng lượng sản phẩm chiết khô trong nước và không lớn hơn 60% trọng lượng etanol trong nước,

(l) chiết dung dịch chứa nước hoặc dung dịch etanolic chứa nước ở bước (k) bằng dung môi béo có nhiệt độ sôi nằm trong khoảng 60°C đến 100°C, tách pha chứa nước ra khỏi pha dung môi béo để thu được pha nước,

(m) cô đặc pha nước thu được ở bước (l) trong áp suất giảm và ở nhiệt độ không lớn hơn 60°C đến 80°C thu được sản phẩm chiết khô có hàm lượng nước nhỏ hơn 5% trọng lượng.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đối với dung môi chiết ở bước (a), sử dụng axeton chứa nước có hàm lượng axeton nằm trong khoảng 50% đến 70% trọng lượng.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó đối với dung môi chiết ở bước (a), sử dụng axeton chứa nước có hàm lượng axeton khoảng 60% trọng lượng.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó đối với dung môi chiết ở bước (a), sử dụng alkanol chứa nước, được chọn từ metanol, etanol, 1-propanol và 2-propanol, có hàm lượng alkanol khoảng 50% đến 70% trọng lượng.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó đối với dung môi chiết ở bước (a), sử dụng etanol chứa nước có hàm lượng etanol khoảng 60% trọng lượng.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó ở bước (c) dung dịch nước pha loãng được làm lạnh đến nhiệt độ dưới 12°C.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó ở bước (d) bổ sung ít nhất 30% trọng lượng amoni sulfat đối với dung dịch nước ở bước (c).
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó ở bước (d) dung dịch được chiết bằng hỗn hợp metyl etyl keton và axeton theo tỷ lệ 7/3 đến 3/4 (m/m).
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó ở bước (i) dung dịch được chiết bằng 1-butanol.
10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó ở bước (l) dung dịch được chiết bằng heptan.
11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó heptan là n-heptan hoặc hỗn hợp của các chất đồng phân heptan có tỷ lệ n-heptan lớn hơn 35% trọng lượng.
12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó phương pháp này bao gồm các bước bổ sung sau:
 - (n) điều chế dung dịch etanolic chứa nước dùng để chiết lá cây bạch quả có hàm lượng etanol nằm trong khoảng 40% đến 60% trọng lượng từ pha nước ở bước (k) hoặc từ sản phẩm chiết khô ở bước (m),
 - (o) đưa dung dịch etanolic chứa nước dùng để chiết lá cây bạch quả ở bước (n) lên chất trao đổi ion axit mạnh là nhựa polystyren liên kết với các nhóm axit sul-

fonic để loại bỏ 4'-O-metyl pyridoxin còn lại trong chất trao đổi ion và rửa giải sử dụng etanol chứa nước để thu được dung dịch chiết không chứa 4'-O-metyl pyridoxin làm dung dịch rửa giải,

(p) cô đặc dung dịch rửa giải ở bước (o) trong áp suất giảm và làm khô ở nhiệt độ không cao hơn 60°C đến 80°C đến khi sản phẩm chiết khô có hàm lượng nước ít hơn 5% trọng lượng.