



(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)



1-0034540

(51)⁷ C07H 17/00; C07H 17/07

(13) B

(21) 1-2016-01852

(22) 20/05/2016

(45) 25/01/2023 418

(43) 27/11/2017 356A

(73) 1. MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FOERDERUNG DER
WISSENSCHAFTEN EV (DE)

Hofgartenstrasse 8, 80539 Muenchen, Germany

2. Nguyễn Minh Tân (VN)

Số 51 Hai Bà Trưng, phường Cửa Nam, quận Hoàn Kiếm, thành phố Hà Nội

3. Vũ Đình Tiến (VN)

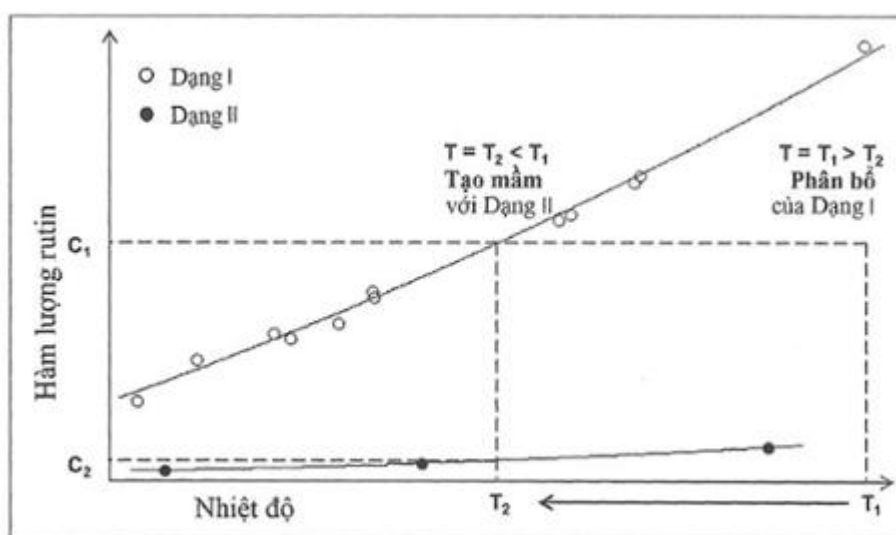
Số 63 đường Giải Phóng, phường Đồng Tâm, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Minh Tân (VN); Vũ Đình Tiến (VN); Elena Horosanskaia (DE); Heike Lorenz (DE); Andreas Seidel-Morgenstern (DE).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ ALNGUYEN (ALNGUYEN IP CO.,LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP TÍNH CHẾ RUTIN

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp tinh chế rutin từ chiết xuất thực vật chứa rutin dựa trên đặc tính hòa tan khác nhau của hai dạng rutin tinh thể Dạng I và Dạng II trong etanol, phương pháp này bao gồm các bước: a. chuẩn bị huyền phù chiết xuất thực vật chứa rutin thô trong etanol có hàm lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 15% theo khối lượng; b. gia nhiệt huyền phù thu được đến khoảng nhiệt độ cao T_1 trong điều kiện khuấy để thu được dung dịch bão hòa; c. tách các tạp chất không tan ra khỏi dung dịch bão hòa; d. bổ sung mầm tinh thể rutin Dạng II vào dung dịch bão hòa ở nhiệt độ thấp T_2 kèm khuấy; e. duy trì khuấy dung dịch để tạo kết tinh ở nhiệt độ T_2 ; và f. tiến hành tách pha rắn-lỏng để thu sản phẩm tinh thể rutin Dạng I. Phương pháp theo sáng chế đạt hiệu suất cao đến 96% và cho sản phẩm là tinh thể rutin Dạng I đạt độ tinh khiết 99%.

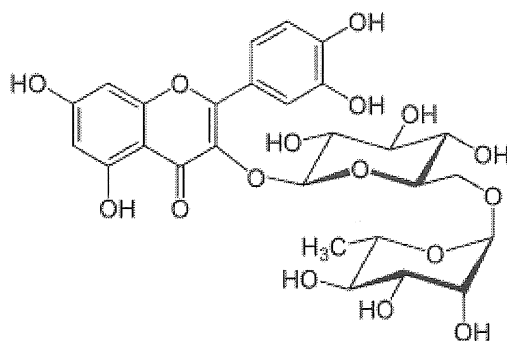


Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp tinh chế rutin, và cụ thể hơn là đề cập đến phương pháp tinh chế rutin dựa trên đặc tính hòa tan khác nhau của hai dạng tinh thể I và II của rutin trong etanol để thu được rutin có độ tinh khiết cao từ chiết xuất thực vật chứa rutin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Rutin là một flavonoid, chất chuyển hóa trung gian của thực vật, có cấu trúc hóa học của phân tử như sau:



Rutin đã được công nhận làm tăng sức bền thành mạch máu, do vậy thường được sử dụng để điều trị giãn tĩnh mạch, xuất huyết trong, đột quỵ do xuất huyết. Rutin còn có các thuộc tính dược lý tốt khác như: chống oxy hóa, chống viêm, chống tăng huyết áp và chống tích mỡ thừa. Do vậy, rutin ngày càng được sử dụng nhiều trong các ngành công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm.

Rutin có trong nhiều hoa, quả và các thành phần khác của trên 70 loài cây khác nhau, nhưng có hàm lượng nhiều nhất trong hoa hòe (*Sophora Japonica*), bạch đàn (*Eucalyptus Macrorhyncha*), mạch ba góc (*Fagopyrum esculentum*). Cây hoa hòe Việt Nam nổi tiếng trên thế giới do có chứa hàm lượng rutin cao (từ 20% đến 34%). Hòe thường được trồng phổ biến ở các tỉnh Thái Bình, Nam Định, Thái Nguyên, Yên Bái và Nghệ An, trong đó hòe ở Thái Bình cho hàm lượng

rutin cao nhất. Hoa hòe và nụ hòe được thu hái vào mùa hè (khoảng từ tháng 5 đến tháng 10), phơi khô, loại bỏ cuống, cành, lá và tạp chất để thành nguyên liệu chính cho chiết xuất rutin. Sản lượng hoa hòe khô của Việt Nam đạt khoảng 10.000 tấn/năm (tương đương khoảng 2.000 tấn rutin). Tuy nhiên do thiếu công nghệ tinh chế tốt, hiện nay Việt Nam mới chỉ sản xuất được rutin thô (hàm lượng rutin đạt khoảng 74-80%). Rutin thô này chưa đủ tiêu chuẩn làm nguyên liệu cho ngành công nghiệp dược phẩm và mỹ phẩm, vì thế có giá xuất khẩu khá thấp ra nước ngoài để tinh chế.

Thực tế là, các phương pháp chiết rutin từ các nguyên liệu thực vật chứa rutin thông thường hiện nay là chiết bằng nước sôi, chiết bằng dung dịch kiềm loãng và chiết bằng cồn. Sản phẩm rutin thu được bằng các phương pháp chiết xuất nêu trên là rutin thô (có hàm lượng từ 74-95%), do vậy chưa đạt tiêu chuẩn làm nguyên liệu cho ngành công nghiệp dược phẩm và mỹ phẩm hiện đại. Một nguyên nhân có thể là do tính tan của nhiều tạp chất trong dung môi khiến chúng khó bị loại ra trong quá trình kết tinh rutin. Một nguyên nhân khác có thể là do các tạp chất này có xu hướng bị hút và bám vào các tinh thể rutin trong quá trình kết tinh và khó được rửa sạch.

Rutin được sử dụng hàng ngày để điều trị cho người bệnh trong thời gian dài, có thể kéo dài nhiều tháng. Rutin cũng được dùng cho phụ nữ mang thai để tránh các tình trạng xuất huyết. Do vậy, rõ ràng là rutin dùng trong bào chế dược phẩm phải là rutin hầu như không có tạp chất (rutin sạch), để tránh nguy cơ tích tụ các tạp chất có thể gây tác dụng phụ cho người bệnh, mẹ và thai nhi. Rutin sạch vì thế có giá trị thương mại cao hơn rutin thô rất nhiều. Thông thường, rutin thô (hàm lượng 75-95%) có giá thấp hơn khoảng 20-30 lần so với rutin tinh khiết (độ sạch đạt 99%).

Do vậy, việc nghiên cứu và phát triển các phương pháp tinh chế rutin thô để thu được rutin sạch (độ tinh khiết đạt đến 99%, rutin 99%) đã và đang được tiến hành ở nhiều nước trên thế giới, chẳng hạn như các phương pháp tinh chế rutin đã được bộc lộ trong patent Mỹ số US 2,520,127 của James F. Couch và các

đồng tác giả, US 2,543,783 A của Krewson Charles F, patent Trung Quốc số CN102718820 B của Liu Zhiqiang. Tuy nhiên, các phương pháp này còn những nhược điểm sau: phức tạp, chi phí cao và khá nguy hiểm do phải thực hiện các bước quy trình ở nhiệt độ sôi của dung môi (cồn ở 78°C, nước ở 100°C) hoặc nhiệt độ quá thấp (gần nhiệt độ đóng băng của nước); chi phí cao do phải sử dụng cồn tuyệt đối; và phải thực hiện nhiều bước quy trình phức tạp, vì thế giá thành của sản phẩm rutin sạch vẫn rất cao.

Do đó, vẫn có nhu cầu nghiên cứu và phát triển phương pháp đơn giản hơn và kinh tế hơn để tinh chế rutin từ chiết xuất thực vật chứa rutin (nguồn nguyên liệu rutin thô có hàm lượng rutin thấp) nhằm thu được rutin có độ tinh khiết cao (đạt 99% độ tinh khiết), đáp ứng được các yêu cầu khắt khe của ngành công nghiệp dược phẩm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa trên cơ sở phát hiện đáng ngạc nhiên của các tác giả sáng chế về đặc tính hòa tan khác nhau của hai dạng tinh thể rutin trong etanol. Sự khác biệt đáng kể giữa các đặc tính tan-nhiệt độ của Dạng I và Dạng II cho phép tách được rutin sạch từ chiết xuất thực vật chứa rutin bằng một chiến lược kết tinh đặc hiệu.

Theo đó, sáng chế đề xuất một phương pháp mới để tinh chế rutin từ chiết xuất thực vật chứa rutin dựa trên đặc tính hòa tan khác nhau của các tinh thể rutin Dạng I và Dạng II trong etanol, phương pháp này bao gồm các bước:

- a. chuẩn bị huyền phù chiết xuất thực vật chứa rutin thô trong etanol có hàm lượng nằm trong khoảng 1-15% theo khối lượng;
- b. gia nhiệt huyền phù thu được đến khoảng nhiệt độ T1 nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong điều kiện khuấy để thu được dung dịch bão hòa;
- c. tách các tạp chất không tan ra khỏi dung dịch bão hòa;

d. bổ sung mầm tinh thể rutin Dạng II vào dung dịch bão hòa ở nhiệt độ thấp T2 nằm trong khoảng từ 20°C đến 35°C, kèm khuấy;

e. duy trì khuấy dung dịch để tạo kết tinh ở nhiệt độ T2; và

f. tiến hành tách pha rắn-lỏng để thu được sản phẩm mong muốn là tinh thể rutin Dạng I.

Phương pháp theo sáng chế có thể được tiến hành kết tinh và tách theo mẻ hoặc kết tinh và tách bán liên tục.

Với cách kết tinh và tách theo mẻ, trong bước d: toàn bộ dung dịch bão hòa được sử dụng cho mỗi mẻ kết tinh.

Với cách kết tinh và tách bán liên tục, sau bước c: dung dịch bão hòa được chia thành nhiều phần cho quá trình kết tinh bán liên tục. Để bắt đầu quy trình, trong bước d: mầm tinh thể được đưa vào phần thứ nhất của dung dịch bão hòa; trong bước f: thu hoạch một phần sản phẩm huyền phù, đồng thời thêm bước g: bổ sung phần tiếp theo của dung dịch bão hòa để tạo kết tinh tiếp trong bước e. Do đó, không cần phải tạo tinh thể mầm mới; và thêm bước h: lặp lại các bước e, f, g cho đến khi sử dụng hết dung dịch bão hòa.

Theo một phương án của sáng chế, mầm tinh thể rutin Dạng II được sử dụng trong bước d được chuẩn bị như sau:

d1. chuẩn bị huyền phù từ tinh thể rutin tinh khiết Dạng I trong etanol có hàm lượng nằm trong khoảng 10-20% theo khối lượng, tốt hơn là khoảng 12-15% theo khối lượng, và tốt nhất là khoảng 14,3% theo khối lượng, tốt hơn sử dụng thiết bị khuấy từ đơn giản;

d2. khuấy huyền phù ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 42°C đến 47°C, và tốt nhất là khoảng 45°C trong một khoảng thời gian nhất định; và

d3. làm mát huyền phù xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 30°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 22°C đến 27°C, tốt nhất là

khoảng 25°C, nghĩa là ở nhiệt độ môi trường, đồng thời duy trì khuấy trong một khoảng thời gian nữa để thu tinh thể rutin Dạng II.

Huyền phù tinh thể rutin Dạng II thu được theo cách trên được sử dụng để tạo mầm và kích hoạt quá trình kết tinh trong phương pháp theo sáng chế.

Ngạc nhiên phát hiện ra rằng các bước của phương pháp theo sáng chế có thể được tiến hành trong các khoảng nhiệt độ không cao hơn nhiều so với nhiệt độ môi trường, nghĩa là ở khoảng nhiệt độ an toàn để tiến hành được các bước của phương pháp một cách đơn giản. Cụ thể là, trong các phương pháp của sáng chế T1 nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 42°C đến 47°C, và tốt nhất là khoảng 45°C, và T2 là nhiệt độ môi trường, nghĩa là nằm trong khoảng từ 20°C đến 35°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 22°C đến 27°C, và tốt nhất là khoảng 25°C.

Sản phẩm tinh thể Dạng I thu được theo phương pháp của sáng chế tốt hơn được rửa bằng etanol, sau đó được làm khô ở nhiệt độ là khoảng 40°C để thu tinh thể rutin Dạng I mong muốn.

Phương pháp theo sáng chế có các bước thực hiện đơn giản, điều kiện thực hiện dễ dàng và an toàn, nhưng cho hiệu suất cao đến 96%, và sản phẩm thu được có thể đạt độ tinh khiết lên đến 99%, được đo bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography – HPLC). Sản phẩm thu được từ phương pháp này đáp ứng tiêu chuẩn của ngành công nghiệp dược phẩm.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế và các điểm ưu việt của sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn qua phần mô tả chi tiết dưới đây kết hợp với các hình vẽ kèm theo, bao gồm:

Fig.1 là đồ thị cho thấy mối liên hệ giữa độ hòa tan của rutin trong etanol và nhiệt độ.

Fig.2 là đồ thị giải thích chiến lược kết tinh rutin từ chiết xuất thực vật chứa rutin theo phương pháp của sáng chế.

Fig.3 là hình ví dụ của thiết bị kết tinh được sử dụng trong một phương án của sáng chế.

Fig.4 là đồ thị thể hiện kết quả quan sát theo thời gian của quy trình kết tinh: trực tung ATR-FTIR thể hiện hàm lượng rutin trong pha lỏng; trực tung FBRM thể hiện phân bố số lượng và kích thước tinh thể rutin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây là phần mô tả chi tiết một hoặc nhiều phương án của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cần hiểu rằng mô tả chi tiết chỉ nhằm tạo điều kiện để người đọc hiểu rõ hơn sáng chế mà không phải là giới hạn phạm vi bảo hộ sáng chế. Các cải biên khác từ các phương án được mô tả ở đây, cũng như các phương án khác đều được hiểu là thuộc nội dung của sáng chế. Do đó, phạm vi bảo hộ sáng chế sẽ được nêu trong các phần Yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Phương pháp tinh chế rutin theo sáng chế dựa trên cơ sở phát hiện đáng ngạc nhiên về đặc tính hòa tan khác nhau của hai dạng tinh thể rutin Dạng I và rutin Dạng II trong etanol như là một hàm của nhiệt độ.

Việc sử dụng các dung môi, bao gồm cả etanol, để chiết xuất rutin từ các bộ phận của thực vật có chứa rutin, sau đó cho kết tinh để thu sản phẩm rutin cũng đã được biết đến. Vì rutin khó hòa tan ở các nhiệt độ thấp, cần phải gia nhiệt hỗn hợp gồm dung môi và các phần của thực vật có chứa rutin đến nhiệt độ sôi của dung môi, ví dụ đến 100°C đối với nước hoặc đến 78°C đối với cồn.

Việc thực hiện các bước ở nhiệt độ cao làm tăng chi phí bảo đảm an toàn cháy, bỏng, chi phí nhiên liệu, cũng như kéo dài thời gian gia nhiệt, thời gian cần để giảm nhiệt để kết tinh.

Ngoài ra, ở nhiệt độ cao, không chỉ có rutin mà còn có nhiều tạp chất khác cũng được hòa tan, và do đó trong quá trình kết tinh chúng có thể được kết tinh cùng với rutin, hoặc dễ dàng hút bám chặt lên bề mặt tinh thể rutin. Do vậy, thành phẩm rutin thu được lẫn nhiều tạp chất, hàm lượng rutin thấp, chỉ đạt

khoảng 74-90%, cao nhất chỉ có thể đến 95%, được gọi là rutin thô. Các rutin thô như vậy không đáp ứng các tiêu chuẩn công nghiệp dược, do vậy cần phải qua tinh chế. Các phương pháp tinh chế hiện nay hoặc vẫn phải thực hiện ở nhiệt độ cao hoặc phải qua nhiều bước quy trình dài và phức tạp với các thiết bị phức tạp để có thể thu được rutin sạch (hàm lượng đạt 99%).

Rutin Dạng I là tinh thể rutin có kích thước khoảng 10 μm . Rutin Dạng I có khả năng hòa tan tốt trong etanol.

Rutin Dạng II là tinh thể rutin có kích thước khoảng 100 μm (còn gọi là mầm tinh thể). Rutin Dạng II có khả năng hòa tan kém trong etanol.

Rutin Dạng I và Dạng II khác nhau về kích thước và độ tan trong etanol.

Nghiên cứu của các tác giả sáng chế ngạc nhiên phát hiện ra rằng có hai dạng tinh thể rutin có đặc tính hòa tan rất khác biệt trong etanol. Fig.1 là đồ thị cho thấy mối liên hệ giữa độ hòa tan của tinh thể rutin Dạng I và tinh thể rutin Dạng II trong etanol theo nhiệt độ. Như có thể thấy, tinh thể rutin Dạng I và Dạng II khác nhau về kích thước. Rutin Dạng I có khả năng hòa tan gấp nhiều lần trong etanol (khoảng 10 lần) so với rutin Dạng II. Các phát hiện này về sự khác biệt trong tính hòa tan là đặc biệt quan trọng giúp tách được rutin đạt độ tinh khiết cao từ chiết xuất thực vật chứa rutin bằng chiến lược kết tinh riêng biệt (xem Fig.2) với các điểm ưu việt nổi bật sau: thao tác đơn giản chỉ với ít bước; điều kiện thực hiện thuận tiện (chẳng hạn không phải làm lạnh xuống dưới nhiệt độ môi trường); không có sự thay đổi hay thao tác phức tạp với dung môi; có thể tái sử dụng dung môi etanol; quy trình đạt hiệu suất cao lên đến 96%; và thành phẩm rutin đạt độ sạch cao lên đến 99%.

Với hàm lượng nằm trong khoảng 1-10% theo khối lượng, rutin Dạng I tan hoàn toàn trong etanol ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C, tốt hơn ở nhiệt độ khoảng 45°C, trong khi đó hầu hết các tạp chất không tan hoặc rất ít tan ở nhiệt độ thấp này. Do đó, các tạp chất này có thể dễ dàng được lọc loại để thu dung dịch sạch (dung dịch bão hòa) giàu rutin. Đây là một trong số nhiều điểm

khác biệt và ưu việt của phương pháp theo sáng chế so với các phương pháp tinh chế rutin hiện có.

Rutin thô có thể mua được từ các nhà sản xuất rutin thô của Việt Nam, chứa khoảng 74-80% rutin dạng I.

Etanol dùng cho phương pháp theo sáng chế là etanol công nghiệp, chẳng hạn như etanol 96%, sẵn có trên thị trường.

Hàm lượng tinh thể rutin Dạng I trong huyền phù ở bước a nằm trong khoảng 1-15% theo khối lượng, tốt hơn nằm trong khoảng 2-9% theo khối lượng. Trong phương pháp kết tinh theo mẻ, hàm lượng tinh thể rutin Dạng I trong etanol nằm trong khoảng 6-10%, tốt hơn là khoảng 7-9%, và tốt nhất là khoảng 8,05% theo khối lượng. Trong phương pháp kết tinh bán liên tục, hàm lượng tinh thể rutin Dạng I trong etanol nằm trong khoảng 1-4%, tốt hơn là khoảng 1,5-3%, và tốt nhất là khoảng 2-2,5% theo khối lượng. Các khoảng hàm lượng là để đảm bảo rằng dung dịch rutin Dạng I sẽ trở nên bão hòa khi dung dịch này được làm mát đến nhiệt độ môi trường, là một trong hai điều kiện để xảy ra kết tinh.

Phương pháp theo sáng chế có thể được tiến hành theo cách kết tinh theo mẻ hoặc kết tinh bán liên tục hoặc các cách thức tương tự, trong đó kết tinh theo mẻ hoặc kết tinh bán liên tục được ưu tiên.

Theo cách kết tinh theo mẻ, trong bước d: toàn bộ dung dịch bão hòa được sử dụng cho mỗi mẻ kết tinh.

Theo cách kết tinh bán liên tục, sau bước c: dung dịch bão hòa được chia thành nhiều phần cho quá trình kết tinh bán liên tục. Để bắt đầu phương pháp, trong bước d: đưa tinh thể mầm vào một phần dung dịch bão hòa; trong bước f: thu hoạch một phần sản phẩm huyền phù, đồng thời trong bước g: bổ sung phần tiếp theo của dung dịch bão hòa để tạo kết tinh tiếp trong bước e. Do đó, không cần phải tạo tinh thể mầm mới. Trong bước h: lặp lại các bước e, f, g cho đến khi sử dụng hết dung dịch bão hòa. Fig.4 là đồ thị cho thấy hàm lượng rutin trong

pha lỏng, phân bố số lượng và kích thước tinh thể trong quá trình kết tinh bán liên tục, được thực hiện như trong Ví dụ 3 sau đây.

Thiết bị kết tinh được sử dụng cho phương pháp theo sáng chế là thiết bị kết tinh thích hợp thông thường, chẳng hạn như bình kết tinh thủy tinh hai vỏ, được trang bị thiết bị điều khiển và theo dõi nhiệt độ, thiết bị khuấy từ đơn giản. Bình này còn có thể được trang bị các máy quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier phản xạ toàn phần tắt dần ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy – ATR-FTIR) để theo dõi hàm lượng trong pha lỏng, thiết bị đo phản xạ chùm tập trung FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement – FBRM) để theo dõi số lượng và phân bố kích thước tinh thể. Đối với cách thức kết tinh và tách bán liên tục, thiết bị này còn có thêm vòi tháo sản phẩm kết tinh được đặt ở đáy bình. Fig.3 là hình một bình kết tinh và các đầu liên kết của nó với các thiết bị được sử dụng theo một phương án của sáng chế. Như có thể thấy, việc theo dõi hàm lượng mong muốn trong pha dung dịch cũng như kích thước mong muốn của tinh thể và sự phân bố kích thước trong suốt quá trình kết tinh xảy ra có thể được quan sát và kiểm soát trở nên khá dễ dàng và đơn giản.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây nhằm mục đích để hiểu rõ sáng chế hơn, mà không nhằm giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Tạo huyền phù tinh thể mầm dạng II trong etanol cho các Ví dụ 1-3:

Hòa tan 0,5g tinh thể rutin tinh khiết Dạng I trong 3,0g etanol (14,3% theo khối lượng) trong một bình nhỏ được trang bị khuấy từ. Khuấy huyền phù thu được ở nhiệt độ 45°C trong 10 phút. Sau đó làm mát huyền phù đến nhiệt độ môi trường, duy trì khuấy thêm 24 giờ cho chuyển hóa tinh thể rutin Dạng I thành tinh thể rutin Dạng II. Lấy 1ml huyền phù tinh thể rutin Dạng II vào các ống xylanh để gây mầm trong các Ví dụ 1-3 sau đây.

Ví dụ 1: Tách theo mẻ

Hóa chất: chiết xuất thực vật mua tại Việt Nam chứa 86,5% tinh thể rutin Dạng I; etanol 96%.

Thiết bị: bình đựng (cốc mở, bình thủy tinh); thiết bị kết tinh hai vỏ (dung tích khoảng 0,1l); cảm biến nhiệt Pt-100 và bộ điều chỉnh nhiệt để kiểm soát nhiệt độ; máy khuấy từ đơn giản; máy phân tích HPLC để xác định độ tinh khiết của sản phẩm thu được.

Hòa 10,5g chiết xuất thực vật chứa rutin Dạng I đã được nghiền (hàm lượng 86,5%) vào 120g etanol (96%) trong cốc mở để thu huyền phù rutin (hàm lượng 8,05% theo khối lượng). Gia nhiệt huyền phù đến 45°C kèm khuấy trong 30 phút để thu được dung dịch bão hòa. Sau đó, lọc loại các tạp chất không tan ra khỏi dung dịch bão hòa. Đổ dung dịch bão hòa sạch vào thiết bị kết tinh được đặt nhiệt độ ở 25°C. Duy trì ổn định nhiệt độ và kèm khuấy, đồng thời thêm 1ml huyền phù tinh thể mầm rutin Dạng II vào thiết bị kết tinh. Duy trì khuấy dung dịch để tạo kết tinh thêm 40 phút. Sau đó, tiến hành tách pha rắn-lỏng sản phẩm huyền phù thu được. Rửa tinh thể thu được bằng etanol, sau đó được làm khô ở nhiệt độ 40°C để thu thành phẩm tinh thể rutin Dạng I.

Phân tích độ tinh khiết của sản phẩm và hiệu suất:

Đầu vào: 10,5g chiết xuất thực vật chứa rutin nghiền nhỏ có hàm lượng 86,5% (nghĩa là 9,08g tinh thể rutin Dạng I). Sản phẩm: 8,88g tinh thể rutin Dạng I, 99% tinh khiết, 97,7% hiệu suất.

Ví dụ 2: Thử nghiệm bán liên tục quy mô 0,1lít

Hóa chất: chiết xuất thực vật mua tại Việt Nam chứa 86,5% tinh thể rutin Dạng I; etanol 96%.

Thiết bị: bình đựng (cốc mở, bình thủy tinh); thiết bị kết tinh hai vỏ (khoảng 0,19l); cảm biến nhiệt Pt-100 và bộ điều chỉnh nhiệt để kiểm soát nhiệt độ; máy khuấy đĩa; đầu dò ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy, ReactIR45m, Mettler Toledo, Switzerland) để theo dõi hàm lượng đích trong pha lỏng; đầu dò FBRM (Focused Beam

Reflectance Measurement, S400A, Mettler Toledo, Switzerland) để theo dõi phân bố số lượng và kích thước tinh thể đích; máy phân tích HPLC để xác định độ tinh khiết của sản phẩm thu được.

Hòa 5,02g chiết xuất thực vật chứa rutin nghiền nhỏ Dạng I có hàm lượng 86,5% vào 240g etanol 96% trong cốc mở để thu huyền phù rutin (có hàm lượng 2,05% theo khối lượng). Gia nhiệt huyền phù đến 45°C kèm khuấy trong 30 phút để thu được dung dịch bão hòa. Sau đó, lọc loại các tạp chất không tan ra khỏi dung dịch bão hòa. Đổ 1/2 phần dung dịch bão hòa đã lọc sạch (120ml) vào thiết bị kết tinh (qua miệng nạp) được đặt nhiệt độ ở 25°C. Duy trì ổn định nhiệt độ và kèm khuấy, đồng thời bổ sung huyền phù tinh thể rutin 1ml Dạng II vào thiết bị kết tinh. Duy trì khuấy dung dịch để tạo kết tinh thêm 40 phút. Tháo thu hoạch 40ml sản phẩm huyền phù (qua cửa tháo thu hoạch sản phẩm); sau đó thêm 40ml dung dịch bão hòa mới từ phần dung dịch còn lại vào (qua miệng nạp). Lặp lại hai bước cuối hai lần cho đến khi sử dụng hết 120ml dung dịch bão hòa. Sau đó, tiến hành tách pha rắn-lỏng sản phẩm huyền phù thu được. Rửa tinh thể thu được bằng etanol, sau đó được làm khô ở nhiệt độ 40°C để thu thành phẩm tinh thể rutin Dạng I.

Phân tích độ tinh khiết của sản phẩm và hiệu suất:

Đầu vào: 5,02g chiết xuất thực vật chứa rutin nghiền nhỏ 86,5% tinh khiết (nghĩa là 4,34g tinh thể rutin Dạng I). Đầu ra: 0,11g (khô) các tạp chất không tan được lọc loại, và 1,8g còn trong phần pha lỏng sau tách pha rắn-lỏng và làm khô. Sản phẩm: 3.18g tinh thể rutin Dạng I, 99% tinh khiết, 73.3% hiệu suất.

Ví dụ 3: Thử nghiệm bán liên tục quy mô 1lít

Hóa chất: chiết xuất thực vật mua tại Việt Nam chứa 86,5% tinh thể rutin Dạng I; etanol 96%.

Thiết bị: bình đựng (cốc mở, bình thủy tinh); thiết bị kết tinh hai vỏ (khoảng 1l); cảm biến nhiệt Pt-100 và bộ điều chỉnh nhiệt để kiểm soát nhiệt độ; máy khuấy đũa; đầu dò ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection Fourier Trans

Dạng Infrared Spectroscopy, ReactIR45m, Mettler Toledo, Switzerland) để theo dõi hàm lượng đích trong pha lỏng; đầu dò FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement, S400A, Mettler Toledo, Switzerland) để theo dõi phân bố số lượng và kích thước tinh thể đích; máy phân tích HPLC để xác định độ tinh khiết của sản phẩm thu được.

Hòa 33,07g chiết xuất thực vật chứa rutin nghiền nhỏ Dạng I (có hàm lượng 86,5%) vào 1,600g (khoảng 2,000ml) etanol (96%) trong bình thủy tinh để thu huyền phù rutin có hàm lượng 2,03% theo khối lượng. Gia nhiệt huyền phù đến 45°C kèm khuấy trong 30 phút để thu được dung dịch bão hòa. Sau đó, lọc loại các tạp chất không tan ra khỏi dung dịch bão hòa. Đổ 1/2 phần dung dịch bão hòa đã lọc sạch (1,000ml) vào thiết bị kết tinh (qua miệng nạp) được đặt nhiệt độ ở 25°C. Duy trì ổn định nhiệt độ và kèm khuấy, đồng thời bổ sung huyền phù tinh thể mầm rutin 1ml Dạng II vào thiết bị kết tinh. Duy trì khuấy dung dịch để tạo kết tinh thêm 60 phút. Tháo thu hoạch 250ml sản phẩm huyền phù (qua cửa tháo thu hoạch sản phẩm), rồi đổ 250ml dung dịch bão hòa mới từ phần dung dịch còn lại vào (qua miệng nạp), và tiếp tục khuấy thêm 240 phút ở nhiệt độ 25°C. Lặp lại hai bước cuối ba lần. Tiến hành tách pha rắn-lỏng sản phẩm huyền phù thu được để thu sản phẩm rắn. Rửa tinh thể thu được bằng etanol, sau đó được làm khô ở nhiệt độ 40°C để thu thành phẩm tinh thể rutin Dạng I.

Phân tích độ tinh khiết của sản phẩm và hiệu suất:

Đầu vào: 33,07g chiết xuất thực vật chứa rutin nghiền nhỏ 86,5% tinh khiết (nghĩa là 28,6g tinh thể rutin Dạng I). Đầu ra: 0,85g (khô) các tạp chất không tan, và 13,51g còn trong phần pha lỏng sau tách pha rắn-lỏng và làm khô. Sản phẩm: 4,45g tinh thể rutin Dạng I, 99% tinh khiết và 31,1% hiệu suất (quãng 1-240 phút); và 13,87g tinh thể rutin Dạng I, 99% tinh khiết và 96,3% hiệu suất (quãng 241-480 phút).

Các đặc điểm kỹ thuật được nêu trong bản mô tả này có thể được kết hợp với nhau theo bất kỳ cách thích hợp nào. Mỗi đặc điểm kỹ thuật này cũng có thể

được cải biên thành một biến thể khác nhưng vẫn đạt được mục đích tương đương. Do vậy, trừ khi được quy định khác, mỗi đặc điểm kỹ thuật được bộc lộ trong bản mô tả này chỉ là một ví dụ về một trong số hàng loạt các phương án có đặc điểm kỹ thuật tương đương

Trên đây chỉ là các phương án ví dụ của sáng chế, mà không phải làm hạn chế sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đều hiểu sáng chế có thể có nhiều cải biên và thay đổi. Bất kỳ sự cải biên, thay thế tương đương, cải tiến và các thay đổi tương tự được thực hiện theo nguyên lý của sáng chế đều nằm trong phạm vi bảo hộ được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Việc các tác giả sáng chế phát hiện ra đặc tính hòa tan của hai dạng tinh thể rutin I và II và tìm ra được chiến lược kết tinh, mà cụ thể là rutin thô dạng I được cho hòa tan ở nhiệt độ T1 nằm trong khoảng từ 40 đến 50°C để thu dung dịch rutin dạng I bão hòa, và dung dịch rutin dạng I bão hòa này được tạo kết tinh bằng tinh thể mầm rutin dạng II ở nhiệt độ môi trường T2 nằm trong khoảng từ 20 đến 35°C để thu sản phẩm tinh thể rutin dạng I, khiến phương pháp theo sáng chế có được các điểm ưu việt mà các công nghệ tinh chế rutin hiện nay không có được, cụ thể là:

1. Giảm giá thành sản xuất do giảm chi phí cho việc gia nhiệt cao và hạ nhiệt thấp. Các bước thực hiện có thể được tiến hành trong các khoảng nhiệt độ T1-T2 hẹp, và không cao hơn nhiều so với nhiệt độ môi trường giúp giảm đáng kể chi phí sản xuất do không phải gia nhiệt quá cao để hòa tan rutin thô hoặc phải hạ nhiệt xuống quá thấp để tạo điều kiện kết tinh rutin. Trong khi đó, các phương pháp hiện có phải thực hiện hòa tan rutin thô ở nhiệt độ sôi của dung môi cao (cồn ở 78°C, nước ở 100°C) và nhiệt độ kết tinh quá thấp (gần nhiệt độ đóng băng của nước) khiến tăng chi phí sản xuất cho việc gia nhiệt và hạ nhiệt.

2. Tăng độ an toàn sản xuất, và không yêu cầu trang thiết bị sản xuất phức tạp. Vì khoảng nhiệt độ T1-T2 để thực hiện ở các bước là bằng và cao hơn nhiệt độ môi trường không nhiều, độ an toàn sản xuất cao hơn cũng như trang thiết bị sản xuất không yêu cầu đặc biệt như đối với các phương pháp hiện có, phải thực hiện ở các nhiệt độ sôi của dung môi cao (cồn ở 78°C, nước ở 100°C) và nhiệt độ kết tinh quá thấp quá thấp (gần nhiệt độ đóng băng của nước).

3. Độ sạch của rutin dạng I thu được đến 99% so với sản phẩm rutin thu được các phương pháp thông thường hiện có chỉ đạt được khoảng 74-80%. Việc thực hiện hòa tan rutin thô dạng I ở nhiệt độ T2 tương đối thấp (40-50°C) cũng như khoảng nhiệt độ T1-T2 để thực hiện các bước là khá hẹp (20-50°C) khiến tránh được việc hòa tan của hầu hết các tạp chất vào dung dịch rutin bão hòa, góp phần vào việc thu được sản phẩm rutin tinh thể dạng I có độ sạch cao đến 99%, đáp ứng được các yêu cầu khắt khe của ngành công nghiệp dược phẩm.

4. Hiệu suất cao đến 96%.

5. Sử dụng dung môi là etanol công nghiệp (etanol 96%, sẵn có trên thị trường), làm giảm giá thành sản phẩm so với việc phải dùng etanol nguyên chất (giá thành cao) như trong một số phương pháp hiện có. Có thể tái sử dụng dung môi etanol.

6. Thao tác đơn giản chỉ với ít bước, không có sự thay đổi hay thao tác phức tạp với dung môi, có thể tái sử dụng dung môi etanol, phương pháp theo sáng chế đạt hiệu suất cao lên đến 96%; và thành phẩm rutin đạt độ tinh sạch cao lên đến 99%.

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp tinh chế rutin từ chiết xuất thực vật chứa rutin dựa trên đặc tính hòa tan khác nhau của hai dạng tinh thể rutin trong etanol, phương pháp này bao gồm các bước:

a. chuẩn bị huyền phù của chiết xuất thực vật chứa rutin thô trong etanol có hàm lượng nằm trong khoảng 1-15% theo khối lượng;

b. gia nhiệt huyền phù thu được đến khoảng nhiệt độ T1 nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong điều kiện khuấy để thu được dung dịch bão hòa;

c. tách các tạp chất không tan ra khỏi dung dịch bão hòa;

d. bổ sung mầm tinh thể rutin Dạng II có kích thước khoảng 100µm vào dung dịch bão hòa ở nhiệt độ thấp T2 nằm trong khoảng từ 20°C đến 35°C, kèm khuấy;

e. duy trì khuấy dung dịch để tạo kết tinh ở nhiệt độ T2; và

f. tiến hành tách pha rắn-lỏng để thu được sản phẩm mong muốn là tinh thể rutin Dạng I có kích thước khoảng 10µm.

2. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 1, trong đó T1 nằm trong khoảng từ 42°C đến 47°C.

3. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 2, trong đó T1 là khoảng 45°C.

4. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 1, trong đó T2 nằm trong khoảng từ 22°C đến 27°C.

5. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 4, trong đó T2 là khoảng 25°C.

6. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 1, trong đó mầm tinh thể rutin Dạng II được sử dụng trong bước d được tạo ra theo các bước:

d1. chuẩn bị huyền phù tinh thể rutin Dạng I trong etanol có hàm lượng nằm trong khoảng 10-20%;

d2. khuấy huyền phù ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 50°C trong một khoảng thời gian nhất định; và

d3. làm mát huyền phù xuống nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 30°C đồng thời duy trì khuấy để thu tinh thể rutin Dạng II, làm tinh thể mầm rutin.

7. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 6, trong đó bước d2 được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 42°C đến 47°C.

8. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 7, trong đó bước d2 được tiến hành ở nhiệt độ khoảng 45°C.

9. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 6, trong đó bước d3 được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22°C đến 27°C.

10. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 9, trong đó bước d2 được tiến hành ở nhiệt độ khoảng 25°C.

11. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 6, trong đó rutin được sử dụng trong bước d1 là tinh thể rutin tinh khiết Dạng I.

12. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 6, trong đó etanol được sử dụng trong bước d1 là etanol tuyệt đối.

13. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 6, trong đó huyền phù tinh thể rutin Dạng I trong etanol được chuẩn bị ở bước d1 có hàm lượng nằm trong khoảng 12-15%.

14. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 13, trong đó huyền phù tinh thể rutin Dạng I trong etanol được chuẩn bị ở bước d1 có hàm lượng là khoảng 14,3%.

15. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 6, trong đó các bước d1-d3 được tiến hành trong điều kiện khuấy.

16. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 1, trong đó ở bước d, toàn bộ dung dịch bão hòa được sử dụng cho mỗi mẻ kết tinh.

17. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 16, trong đó hàm lượng tinh thể rutin Dạng I trong huyền phù ở bước a nằm trong khoảng từ 6 đến 10% theo khối lượng.
18. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 17, trong đó hàm lượng tinh thể rutin Dạng I trong huyền phù ở bước a nằm trong khoảng từ 7 đến 9% theo khối lượng.
19. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 18, trong đó hàm lượng tinh thể rutin Dạng I trong huyền phù ở bước a là khoảng 8,05% theo khối lượng.
20. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 1, trong đó sau bước c: dung dịch bão hòa được chia thành nhiều phần dùng cho quá trình kết tinh bán liên tục; và trong bước f: thu hoạch một phần sản phẩm huyền phù, sau đó tách pha rắn-lỏng để thu tinh thể rutin Dạng I; đồng thời còn thêm các bước g và h, trong đó trong bước g: bổ sung một phần dung dịch bão hòa vào thiết bị kết tinh để tạo kết tinh; và trong bước h: lặp lại các bước e, f, g cho đến khi sử dụng hết dung dịch bão hòa.
21. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 20, trong đó hàm lượng tinh thể rutin Dạng I trong huyền phù ở bước a nằm trong khoảng từ 1 đến 4% theo khối lượng.
22. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 21, trong đó hàm lượng tinh thể rutin Dạng I trong huyền phù ở bước a nằm trong khoảng từ 1,5 đến 3% theo khối lượng.
23. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm 22, trong đó hàm lượng tinh thể rutin Dạng I trong huyền phù ở bước a nằm trong khoảng từ 2 đến 2,5% theo khối lượng.
24. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó tinh thể rutin Dạng I được sử dụng trong bước a là chiết xuất rutin thô có độ sạch khoảng 86,5%.
25. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó ethanol được sử dụng trong bước a là ethanol công nghiệp nồng độ 96%.

26. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó sản phẩm thu được tinh thể rutin Dạng I đạt độ tinh khiết 99%.

27. Phương pháp tinh chế rutin theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó hiệu suất của phương pháp này đạt đến 96%.

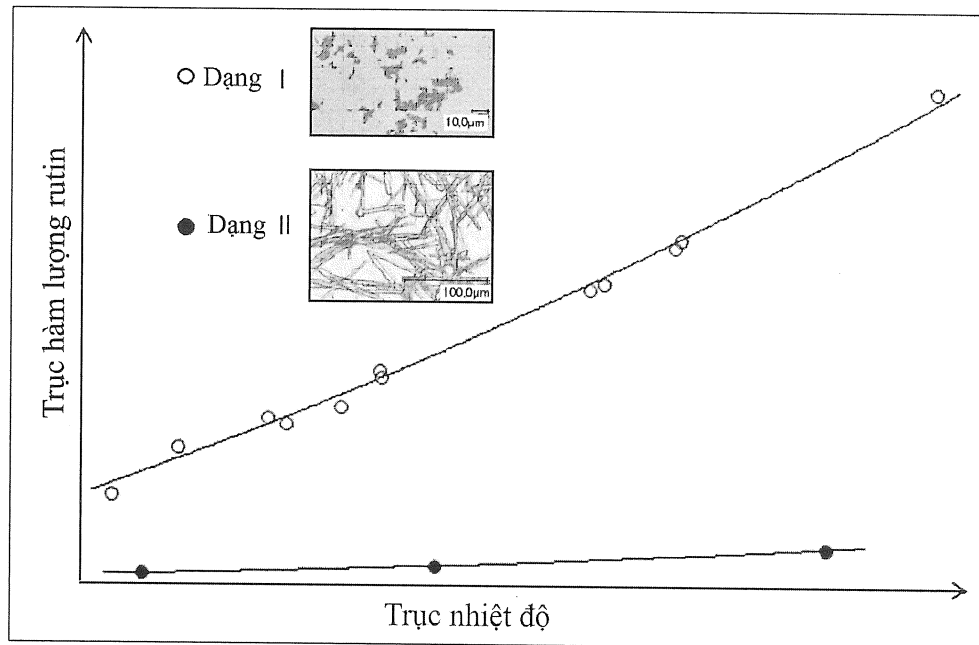


FIG. 1

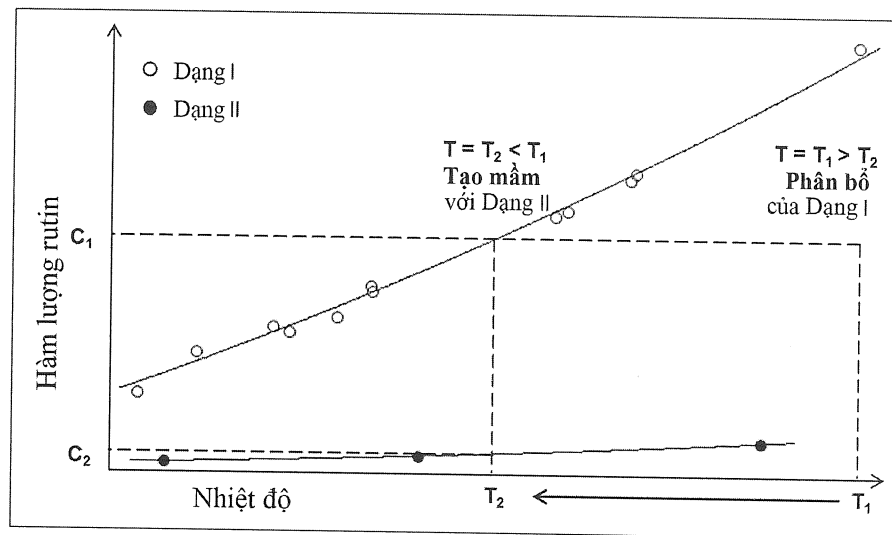


FIG. 2

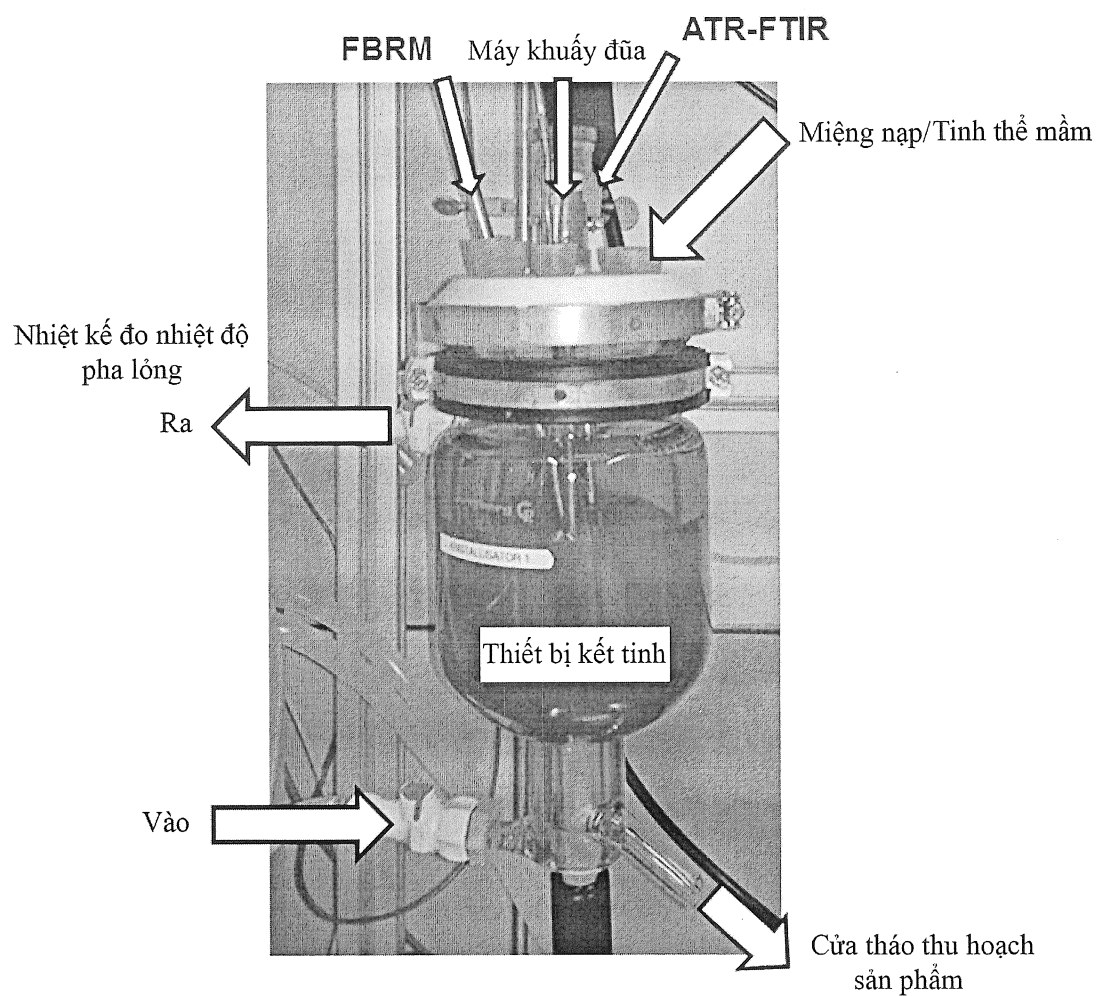


FIG. 3

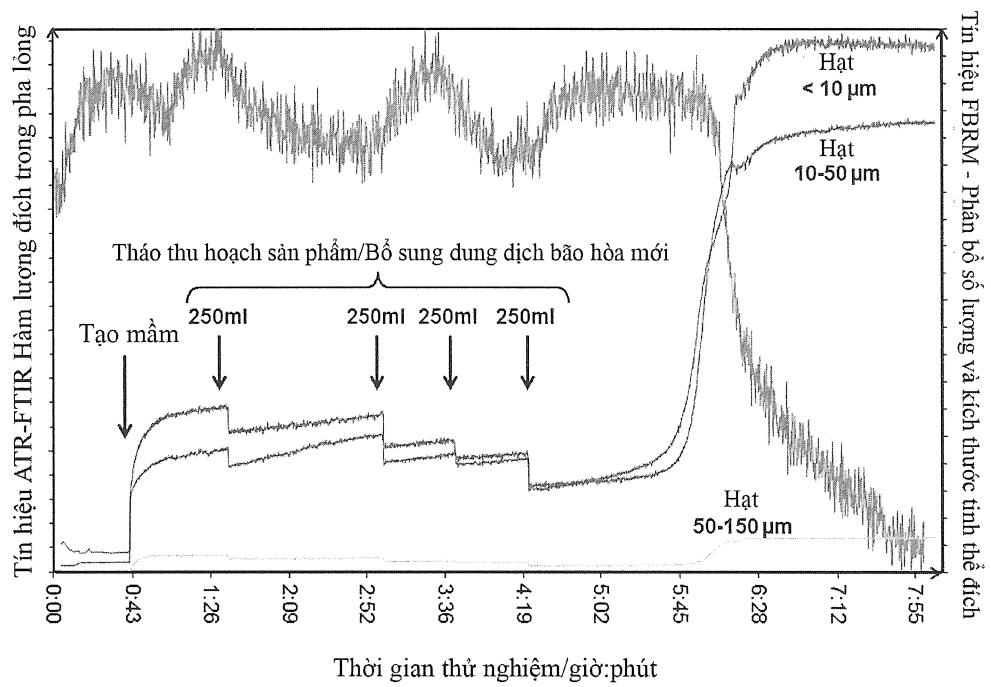


FIG. 4