



(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)



1-0043220

(51)^{2021.01} C07H 15/256; B01D 9/02; A23L 2/60; (13) B
A23L 27/00

(21) 1-2022-03381

(22) 30/10/2020

(86) PCT/JP2020/040974 30/10/2020

(87) WO 2021/085643 06/05/2021

(30) 2019-200256 01/11/2019 JP

(45) 25/02/2025 443

(43) 25/08/2022 413

(73) SUNTORY HOLDINGS LIMITED (JP)

1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 5308203, Japan

(72) URAI Soichiro (JP); UTSUMI Yui (JP); TAKAYANAGI Keisuke (JP); NISHIBORI Tomoyuki (JP); MITSUI Ryoki (JP); YOKOO Yoshiaki (JP); NAGAO Koji (JP).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM KẾT TINH CHỨA REBAUDIOSIT-D VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM THỰC PHẨM HOẶC ĐỒ UỐNG SỬ DỤNG SẢN PHẨM KẾT TINH NÀY

(21) 1-2022-03381

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp mới để sản xuất sản phẩm kết tinh RebD. Phương pháp sản xuất sản phẩm kết tinh chứa RebD theo sáng chế, bao gồm: bước trộn sản phẩm thô có nguồn gốc từ cây cỏ ngọt có tổng hàm lượng steviol glycosit nằm trong khoảng từ 50 đến 95% khối lượng, và chứa ít nhất RebA và RebD, vào trong dung môi chứa metanol hoặc etanol sao cho độ siêu bão hòa của RebD ở 10°C ít nhất bằng 10 và độ siêu bão hòa của RebA ở 10°C không vượt quá 18, và điều chỉnh dung dịch kết tinh; và bước làm nguội dung dịch kết tinh trong điều kiện khuấy trộn và làm cho RebD kết tủa. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống sử dụng sản phẩm kết tinh này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm kết tinh chứa rebaudiosit D, trong đó sản phẩm kết tinh chứa rebaudiosit D có tỷ lệ sản lượng rebaudiosit D cao và chứa rebaudiosit D ở độ tinh khiết cao có thể thu được, và sản phẩm kết tinh chứa rebaudiosit D.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lá của cây cỏ ngọt của họ Asteraceae chứa chất chuyển hóa thứ cấp được gọi là steviol là một trong số các diterpenoit. Các steviol glycosit thể hiện độ ngọt gấp khoảng 300 lần độ ngọt của đường, và do đó được sử dụng làm các chất làm ngọt có ít calo hơn trong ngành công nghiệp thực phẩm. Bệnh béo phì là vấn đề xã hội nghiêm trọng toàn cầu, và các chất làm ngọt có ít calo hơn được yêu cầu ngày càng tăng cũng từ quan điểm tăng cường sức khỏe và giảm chi phí y tế. Aspartam và axesulfam kali, là các dẫn xuất axit amin được tổng hợp nhân tạo, hiện đang được sử dụng làm các chất làm ngọt nhân tạo. Tuy nhiên, các chất làm ngọt xuất hiện trong tự nhiên có ít calo hơn, giống các steviol glycosit, an toàn hơn và được mong đợi là dễ nhận được sự chấp nhận của công chúng.

Cho đến nay đã có một số báo cáo về quá trình tinh chế các steviol glycosit. Chẳng hạn, tài liệu sáng chế 1 bộc lộ phương pháp tinh chế rebaudiosit D bằng cách hòa tan phần chiết của cây cỏ ngọt Bertoni trong dung dịch nước trong dung môi hữu cơ và thực hiện quá trình kết tinh ba hoặc nhiều lần. Tài liệu sáng chế 2 bộc lộ phương pháp liên quan đến việc điều chế chất ban đầu bao gồm ít nhất một steviol glycosit của cây cỏ ngọt và dung dịch rượu trong nước, hòa tan chất ban đầu trong dung dịch rượu trong nước và giữ dung dịch này ở khoảng 24 đến 80°C trong khoảng 1 phút đến khoảng 240 giờ, và tách rắn-lỏng hỗn hợp tạo ra và làm khô để bằng cách đó thu được chế phẩm

steviol glycosit, trong đó chế phẩm steviol glycosit này có độ tan bằng ít nhất 0,01% trong nước ở 20°C.

Tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: Đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 2013-507914

Tài liệu sáng chế 2: Đơn yêu cầu cấp Bằng độc quyền sáng chế Nhật Bản số 2019-518065

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Trong các trường hợp ở trên, phương pháp mới để sản xuất sản phẩm kết tinh RebD hiện đang được yêu cầu.

Giải pháp để giải quyết vấn đề

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất các mục sau đây.

[1] Phương pháp sản xuất sản phẩm kết tinh chứa rebaudiosit D bằng cách sử dụng sản phẩm tinh chế thô thu được bằng cách tinh chế thô phần chiết từ cây cỏ ngọt, trong đó:

tổng hàm lượng steviol glycosit của sản phẩm tinh chế thô nằm trong khoảng từ 50 đến 95% khối lượng và sản phẩm tinh chế thô chứa ít nhất rebaudiosit A và rebaudiosit D,

phương pháp này bao gồm:

bước trộn sản phẩm tinh chế thô trong dung môi chứa metanol hoặc etanol sao cho độ siêu bão hòa ở 10°C của rebaudiosit D lớn hơn hoặc bằng 10 và độ siêu bão hòa ở 10°C của rebaudiosit A nhỏ hơn hoặc bằng 18, để điều chỉnh dung dịch dùng để kết tinh, và

bước làm nguội dung dịch dùng để kết tinh bằng cách khuấy trộn, để kết tủa

rebaudiosit D.

[2] Phương pháp sản xuất theo mục [1], trong đó tổng steviol glycosit tương ứng với rebaudiosit A, rebaudiosit B, rebaudiosit C, rebaudiosit D, steviosit, rebaudiosit F và rebaudiosit M.

[3] Phương pháp sản xuất theo mục [1] hoặc [2], trong đó hàm lượng của rebaudiosit A nằm trong khoảng từ 5 đến 70% khối lượng và hàm lượng của rebaudiosit D nằm trong khoảng từ 2 đến 70% khối lượng trong sản phẩm tinh chế thô.

[4] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [3], trong đó nồng độ của metanol hoặc etanol trong dung môi nhỏ hơn hoặc bằng 99,9% khối lượng.

[5] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [4], trong đó dung môi được giữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 80°C trong bước trộn sản phẩm tinh chế thô.

[6] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [5], trong đó rebaudiosit D được sử dụng làm mầm tinh thể.

[7] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [6], trong đó dung dịch dùng để kết tinh được làm nguội đến nhiệt độ nhỏ hơn hoặc bằng 35°C bằng cách khuấy trộn, để kết tủa rebaudiosit D.

[8] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [7], trong đó dung dịch dùng để kết tinh được làm nguội ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,002 đến 1,37°C/phút bằng cách khuấy trộn, để kết tủa rebaudiosit D.

[9] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [8], trong đó dung dịch dùng để kết tinh được làm nguội trong khoảng thời gian từ 1 đến 48 giờ bằng cách khuấy trộn, để kết tủa rebaudiosit D.

[10] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [9], trong đó sản phẩm tinh chế thô thu được bằng phương pháp bao gồm:

bước chiết để chiết lá khô của cây cỏ ngọt bằng dung môi để thu được phần chiết,

bước tách rắn-lỏng để xử lý tách rắn-lỏng phần chiết để thu được chất lỏng đã được làm trong,

bước keo tụ để bổ sung chất kết tụ vào chất lỏng đã được làm trong để làm keo tụ, để thu được chất lỏng xử lý,

bước tinh chế bằng nhựa để xử lý chất lỏng xử lý bằng nhựa xấp xỉ nước, và

bước cô đặc để cô đặc dung dịch sau khi tinh chế bằng nhựa.

[11] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [10], còn bao gồm bước tách rebaudiosit D kết tủa và pha lỏng, và làm khô rebaudiosit D tách được.

[12] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [10], còn bao gồm:

bước tách và làm khô rebaudiosit D kết tủa, để thu được sản phẩm kết tinh sơ cấp,

bước trộn sản phẩm kết tinh sơ cấp trong dung môi chứa metanol hoặc etanol sao cho độ siêu bão hòa ở 10°C của rebaudiosit D lớn hơn hoặc bằng 10 và độ siêu bão hòa ở 10°C của rebaudiosit A nhỏ hơn hoặc bằng 18, để điều chỉnh chất lỏng hòa tan sản phẩm kết tinh sơ cấp,

bước làm nguội chất lỏng hòa tan sản phẩm kết tinh sơ cấp bằng cách khuấy trộn, để kết tủa rebaudiosit D, và

bước tách và làm khô rebaudiosit D kết tủa.

[13] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [12], trong đó tỷ lệ của rebaudiosit D với tổng steviol glycosit trong sản phẩm kết tinh chứa rebaudiosit D nằm trong khoảng từ 35 đến 95% khối lượng.

[14] Phương pháp sản xuất theo mục [13], trong đó tỷ lệ của rebaudiosit A với tổng

steviol glycosit trong sản phẩm kết tinh chứa rebaudiosit D nằm trong khoảng từ 10 đến 50% khối lượng.

[15] Phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [14], trong đó tỷ lệ của rebaudiosit D kết tinh, với rebaudiosit D được chứa trong sản phẩm tinh chế thô, trong trường hợp kết tinh đơn, nằm trong khoảng từ 70 đến 99% khối lượng.

[16] Sản phẩm kết tinh chứa rebaudiosit D được sản xuất bằng phương pháp sản xuất theo mục bất kỳ trong số các mục từ [1] đến [15].

[17] Sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm sản phẩm kết tinh chứa rebaudiosit D theo mục [16].

[18] Sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống theo mục [17] trong đó sản phẩm này là đồ uống.

Tác dụng có lợi của sáng chế

Theo sáng chế, sản phẩm kết tinh chứa RebD có thể thu được ở độ tinh khiết cao và tỷ lệ sản lượng cao.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Các đường cong độ hòa tan của các nồng độ khác nhau trong dung môi etanol trong ví dụ thử nghiệm 1 được minh họa.

Fig.2: Mối quan hệ giữa tỷ lệ bổ sung RebD và tỷ lệ sản lượng trong ví dụ thử nghiệm 2 được minh họa.

Fig.3: Ảnh hưởng của nồng độ của dung môi etanol lên tỷ lệ thành phần của sản phẩm kết tinh RebD trong ví dụ thử nghiệm 3 được minh họa.

Fig.4: Ảnh hưởng của nồng độ của dung môi etanol lên sản lượng (lượng tinh thể) trong ví dụ thử nghiệm 3 được minh họa.

Fig.5: profin nhiệt độ trong ví dụ thử nghiệm 4 được minh họa.

Fig.6: Ảnh hưởng của tốc độ làm nguội lên tỷ lệ thành phần của sản phẩm kết tinh RebD trong ví dụ thử nghiệm 4 được minh họa.

Fig.7: Ảnh hưởng của tốc độ làm nguội lên sản lượng (lượng tinh thể) trong ví dụ thử nghiệm 4 được minh họa.

Fig.8: profin nhiệt độ trong ví dụ thử nghiệm 5 được minh họa.

Fig.9: Ảnh hưởng của thời gian kết tinh lên tỷ lệ thành phần của sản phẩm kết tinh RebD trong ví dụ thử nghiệm 5 được minh họa.

Fig.10: Ảnh hưởng của thời gian kết tinh lên sản lượng (lượng tinh thể) trong ví dụ thử nghiệm 5 được minh họa.

Fig.11: Ảnh hưởng của nồng độ của dung môi etanol lên tỷ lệ thành phần của sản phẩm kết tinh RebD trong trường hợp quá trình kết tinh thứ cấp được thực hiện, trong ví dụ thử nghiệm 6, được minh họa.

Fig.12: Ảnh hưởng của nồng độ của dung môi etanol lên sản lượng (lượng tinh thể) trong trường hợp quá trình kết tinh thứ cấp được thực hiện, trong ví dụ thử nghiệm 6, được minh họa.

Fig.13: profin nhiệt độ trong quá trình kết tinh thứ cấp trong ví dụ thử nghiệm 14 được minh họa.

Mô tả chi tiết sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Các phương án sau đây được minh họa để mô tả sáng chế, và không được dự định để giới hạn sáng chế chỉ ở các phương án này. Sáng chế có thể được thực hiện theo các phương thức khác mà không đi trệch khỏi ý chính của nó.

Ở đây, “rebaudiosit”, “Reb” và “Reb.” thể hiện các nghĩa giống nhau, và tất cả chúng đều có nghĩa “rebaudiosit”. Điều tương tự được áp dụng to “dulcosit” ở đây.

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất sản phẩm kết tinh chứa rebaudiosit D (RebD) bằng cách hòa tan sản phẩm tinh chế thô thu được bằng cách tinh chế thô phần chiết từ cây cỏ ngọt (dưới đây, đôi khi được gọi đơn giản là “sản phẩm tinh chế

thô”) trong dung môi metanol hoặc etanol để kết tủa RebD dưới dạng tinh thể.

Phương pháp được thực hiện rộng rãi trong lĩnh vực này trước tiên liên quan đến việc tinh chế RebA ra khỏi phần chiết của cây cỏ ngọt và tinh chế RebD ra khỏi nước cái còn lại. Lý do là vì RebA được chứa nhiều hơn RebD trong lá của phần lớn cây cỏ ngọt có sẵn. Tuy nhiên, theo sáng chế, RebD được kết tinh từ giai đoạn kết tinh sơ cấp. Cho rằng RebA được chứa ở nồng độ cao hơn RebD trong sản phẩm tinh chế thô của phần chiết từ cây cỏ ngọt, ngạc nhiên là thu được sản phẩm kết tinh chứa RebD với độ tinh khiết cao mặc dù sử dụng sản phẩm tinh chế thô như vậy làm nguyên liệu thô.

RebA chủ yếu có hàm lượng cao hơn RebD trong lá của cây cỏ ngọt, và do đó cho rằng RebD bị cuốn vào trong quá trình tinh chế RebA theo phương pháp thông thường. Do đó, trong trường hợp ở đó đã cố gắng thu được chế phẩm RebD có độ tinh khiết cao từ nước cái sau quá trình tinh chế RebA, bằng cách thực hiện quá trình tinh chế RebD theo phương pháp thông thường, RebD đã bị cuốn vào trong quá trình tinh chế RebA và do đó nhất thiết phải hạ thấp tỷ lệ sản lượng. Theo sáng chế, quá trình tinh chế RebD mục đích đã được thực hiện để bằng cách đó giải quyết cả hai vấn đề nêu trên và thu được cả độ tinh khiết cao lẫn tỷ lệ sản lượng cao của RebD.

Tinh chế thô

Sản phẩm tinh chế thô của cây cỏ ngọt được sử dụng theo phương pháp sản xuất của sáng chế. Sản phẩm tinh chế thô của cây cỏ ngọt có thể là sản phẩm có sẵn trên thị trường, hoặc có thể thu được bằng cách tinh chế phần chiết từ cây cỏ ngọt, cụ thể, lá của cây cỏ ngọt. Sản phẩm tinh chế thô được sử dụng ở đây có thể còn là sản phẩm thu được bằng cách bổ sung thêm nữa RebD vào sản phẩm có sẵn trên thị trường như vậy hoặc sản phẩm thu được bằng cách tinh chế thô phần chiết.

Trong trường hợp ở đó sản phẩm tinh chế thô thu được bằng cách tinh chế thô phần chiết từ cây cỏ ngọt, phần chiết từ cây cỏ ngọt có thể là sản phẩm có sẵn trên thị trường, hoặc có thể thu được bằng quá trình xử lý chiết cây cỏ ngọt, cụ thể, lá của cây

cỏ ngọt. Các ví dụ của phương pháp thích hợp để thu được sản phẩm tinh chế thô bao gồm phương pháp bao gồm:

(A) bước chiết để chiết lá khô của cây cỏ ngọt bằng dung môi để thu được phần chiết,

(B) bước tách rắn-lỏng để xử lý tách rắn-lỏng phần chiết để thu được chất lỏng đã được làm trong,

(C) bước keo tụ để bổ sung chất kết tụ vào chất lỏng đã được làm trong để làm keo tụ, để thu được chất lỏng xử lý,

(D) bước tinh chế bằng nhựa để xử lý chất lỏng xử lý bằng nhựa xốp kỵ nước, và

(E) bước cô đặc để cô đặc dung dịch sau quá trình tinh chế bằng nhựa.

Dưới đây, phương pháp này có thể được gọi là phương pháp tinh chế thô của sáng chế. Mỗi bước trong số các bước sẽ được mô tả dưới đây.

Theo một khía cạnh của phương pháp tinh chế thô của sáng chế, tỷ lệ hàm lượng nước của lá khô của cây cỏ ngọt nằm trong khoảng từ 1 đến 11% trọng lượng.

(A) Chiết từ lá khô của cây cỏ ngọt

Một khía cạnh của phương pháp tinh chế thô của sáng chế bao gồm việc chiết lá khô của cây cỏ ngọt bằng dung môi trong nước để thu được phần chiết (chất lỏng chiết). Lá khô của cây cỏ ngọt ở đây được dùng để chỉ lá tươi của cây cỏ ngọt, lá này được làm khô và do đó có hàm lượng nước giảm. Tỷ lệ hàm lượng nước của lá khô của cây cỏ ngọt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 10% trọng lượng, tốt hơn nữa là, từ 2 đến 8% trọng lượng, đặc biệt tốt hơn là từ 3 đến 4% trọng lượng. Lá khô của cây cỏ ngọt không bị giới hạn đặc biệt miễn là nó bao gồm steviol glycosit, và tốt hơn khi nó là loại trong đó hàm lượng của RebD hoặc rebaudiosit M (RebM) cao hơn hàm lượng của RebD hoặc rebaudiosit M của lá khô của cây cỏ ngọt tự nhiên. Lá khô của cây cỏ ngọt có thể

thu được bằng, chẳng hạn, phương pháp được mô tả trong, chẳng hạn, công bố đơn quốc tế số WO 2019/074089.

Lá khô được ưu tiên của cây cỏ ngọt, để sử dụng theo phương pháp sản xuất của sáng chế, chứa steviol glycosit với lượng nằm trong khoảng từ 5,0 đến 25g trong 100g lá khô khi tỷ lệ hàm lượng nước nằm trong khoảng từ 3 đến 4% trọng lượng. Lá khô theo các khía cạnh khác có thể chứa steviol glycosit với lượng nằm trong khoảng từ 6,0 đến 24g, 7,0 đến 23g, 8,0 đến 22g, 9,0 đến 21g, 10 đến 20g, hoặc 11 đến 19g trong 100g lá khô khi tỷ lệ hàm lượng nước nằm trong khoảng từ 3 đến 4% trọng lượng.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, lá khô của cây cỏ ngọt, để sử dụng theo phương pháp sản xuất của sáng chế, chứa steviol glycosit với lượng nằm trong khoảng từ 8 đến 17g trong 100g lá khô khi tỷ lệ hàm lượng nước nằm trong khoảng từ 3 đến 4% trọng lượng.

Lá khô được ưu tiên theo khía cạnh này chứa RebD với lượng lớn hơn hoặc bằng 0,5g trong 100g lá khô khi tỷ lệ hàm lượng nước nằm trong khoảng từ 3 đến 4% trọng lượng. Lá khô ưa thích để sử dụng theo các khía cạnh khác chứa RebM với lượng lớn hơn hoặc bằng 0,19g trong 100g lá khô khi tỷ lệ hàm lượng nước nằm trong khoảng từ 3 đến 4% trọng lượng. Lá khô ưa thích để sử dụng theo các khía cạnh khác chứa rebaudiosit A (RebA) với lượng lớn hơn hoặc bằng 3,0g trong 100g lá khô khi tỷ lệ hàm lượng nước nằm trong khoảng từ 3 đến 4% trọng lượng. Theo các khía cạnh được ưu tiên khác, khi tỷ lệ hàm lượng nước của lá khô nằm trong khoảng từ 3 đến 4% trọng lượng, RebD có mặt trong lá khô với lượng lớn hơn hoặc bằng 0,6g, lớn hơn hoặc bằng 0,7g, lớn hơn hoặc bằng 0,8g, lớn hơn hoặc bằng 1,0g, lớn hơn hoặc bằng 1,1g, lớn hơn hoặc bằng 1,2g, lớn hơn hoặc bằng 1,3g, lớn hơn hoặc bằng 1,4g, lớn hơn hoặc bằng 1,5g, lớn hơn hoặc bằng 1,6g, lớn hơn hoặc bằng 1,7g, lớn hơn hoặc bằng 1,8g, lớn hơn hoặc bằng 1,9g, lớn hơn hoặc bằng 2,0g, lớn hơn hoặc bằng 2,1g, lớn hơn hoặc bằng 2,2g, lớn hơn hoặc bằng 2,3g, lớn hơn hoặc bằng 2,4g, lớn hơn hoặc bằng 2,5g, lớn hơn

hoặc bằng 2,6g, lớn hơn hoặc bằng 2,7g, lớn hơn hoặc bằng 2,8g, lớn hơn hoặc bằng 2,9g, lớn hơn hoặc bằng 3,0g, lớn hơn hoặc bằng 3,1g, lớn hơn hoặc bằng 3,2g, lớn hơn hoặc bằng 3,3g, lớn hơn hoặc bằng 3,4g, lớn hơn hoặc bằng 3,5g, lớn hơn hoặc bằng 3,6g, lớn hơn hoặc bằng 3,7g, lớn hơn hoặc bằng 3,8g, lớn hơn hoặc bằng 3,9g, lớn hơn hoặc bằng 4,0g, lớn hơn hoặc bằng 4,1g, lớn hơn hoặc bằng hoặc 4,2g trong 100g lá khô, và có thể có mặt với lượng, chẳng hạn, nhỏ hơn hoặc bằng 6,0g, nhỏ hơn hoặc bằng 5,5g, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 5,0g. Theo cách khác, RebD có thể có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 2,7 đến 8,0g, 3,2 đến 8,0g, 3,7 đến 8,0g, 4,2 đến 8,0g, 4,7 đến 8,0g, 5,2 đến 8,0g, 5,7 đến 8,0g, 6,2 đến 8,0g, 6,7 đến 8,0g, 2,7 đến 7,5g, 3,2 đến 7,5g, 3,7 đến 7,5g, 4,2 đến 7,5g, 4,7 đến 7,5g, 5,2 đến 7,5g, 5,7 đến 7,5g, 6,2 đến 7,5g, 6,7 đến 7,5g, 2,7 đến 7,0g, 3,2 đến 7,0g, 3,7 đến 7,0g, 4,2 đến 7,0g, 4,7 đến 7,0g, 5,2 đến 7,0g, 5,7 đến 7,0g, 6,2 đến 7,0g, hoặc 6,7 đến 7,0g. Theo các khía cạnh được ưu tiên khác, RebM có mặt trong lá khô với lượng lớn hơn hoặc bằng 0,20g, lớn hơn hoặc bằng 0,25g, lớn hơn hoặc bằng 0,30g, lớn hơn hoặc bằng 0,35g, lớn hơn hoặc bằng 0,40g, lớn hơn hoặc bằng 0,45g, lớn hơn hoặc bằng 0,50g, lớn hơn hoặc bằng 0,55g, lớn hơn hoặc bằng 0,60g, lớn hơn hoặc bằng 0,65g, lớn hơn hoặc bằng 0,70g, lớn hơn hoặc bằng 0,75g, lớn hơn hoặc bằng 0,80g, lớn hơn hoặc bằng 0,85g, lớn hơn hoặc bằng 0,90g, lớn hơn hoặc bằng 0,95g, lớn hơn hoặc bằng 1,00g, lớn hơn hoặc bằng 1,05g, lớn hơn hoặc bằng 1,10g, lớn hơn hoặc bằng 1,15g, lớn hơn hoặc bằng 1,20g, lớn hơn hoặc bằng 1,25g, lớn hơn hoặc bằng 1,30g, lớn hơn hoặc bằng 1,35g, lớn hơn hoặc bằng 1,40g, lớn hơn hoặc bằng hoặc 1,45g trên mỗi 100g lá khô, và có thể có mặt với lượng, chẳng hạn, nhỏ hơn hoặc bằng 1,50g, nhỏ hơn hoặc bằng 1,30g, hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 1,20g. Theo các khía cạnh được ưu tiên khác, khi tỷ lệ hàm lượng nước của lá khô nằm trong khoảng từ 3 đến 4% trọng lượng, RebA có mặt với lượng với lượng lớn hơn hoặc bằng 3,0g, lớn hơn hoặc bằng 3,5g, lớn hơn hoặc bằng 4,0g, lớn hơn hoặc bằng 4,5g, lớn hơn hoặc bằng 5,0g, lớn hơn hoặc bằng 5,5g, lớn hơn hoặc bằng 6,0g, lớn hơn hoặc bằng 6,5g, lớn hơn hoặc bằng

7,0g, lớn hơn hoặc bằng 7,5g, lớn hơn hoặc bằng 8,0g, lớn hơn hoặc bằng 8,5g, lớn hơn hoặc bằng 9,0g, lớn hơn hoặc bằng 9,5g, lớn hơn hoặc bằng 10g, lớn hơn hoặc bằng 11g, lớn hơn hoặc bằng 12g, lớn hơn hoặc bằng 13g, lớn hơn hoặc bằng hoặc 14g trong 100g lá khô, và có thể có mặt với lượng, chẳng hạn, nhỏ hơn hoặc bằng 17g, nhỏ hơn hoặc bằng 16g hoặc nhỏ hơn hoặc bằng 15g.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, lá khô có thể chứa RebD với lượng nằm trong khoảng từ 0,5 đến 0,9g hoặc 0,6 đến 0,85g trong 100g lá khô khi tỷ lệ hàm lượng nước nằm trong khoảng từ 3 đến 4% trọng lượng. RebM có thể được chứa trong 100g lá khô có tỷ lệ hàm lượng nước nằm trong khoảng từ 3 đến 4% trọng lượng, với lượng bất kỳ nằm trong khoảng từ 0,2 đến 1,5g, 0,2 đến 1,3g, 0,2 đến 1,2g, 0,2 đến 1g, 0,2 đến 0,8g, 0,2 đến 0,7g, 0,3 đến 1,5g, 0,3 đến 1,3g, 0,3 đến 1,1g, 0,3 đến 0,9g, và 0,3 đến 0,7g. RebA có thể được chứa trong 100g lá khô có tỷ lệ hàm lượng nước nằm trong khoảng từ 3 đến 4% trọng lượng, với lượng bất kỳ nằm trong khoảng từ 3 đến 17g, 3 đến 16g, 3 đến 15g, 3 đến 14g, 3 đến 13g, 3 đến 12g, 5 đến 17g, 5 đến 16g, 5 đến 15g, 5 đến 14g, 5 đến 13g, 5 đến 12g, 6 đến 17g, 6 đến 16g, 6 đến 15g, 6 đến 14g, 6 đến 13g, 6 đến 12g, và 6 đến 11g.

Quá trình chiết steviol glycosit ra khỏi lá khô có thể được thực hiện bằng cách sử dụng dung môi như nước hoặc rượu, hoặc dung dịch hỗn hợp của chúng. Các ví dụ của dung môi chiết được ưu tiên bao gồm nước trao đổi ion, nước tinh khiết (chẳng hạn, nước milliQ) và dung dịch etanol trong nước. Trong khi chiết, lá khô có thể được nghiền mịn. Trong trường hợp nghiền mịn, quá trình nghiền mịn có thể được thực hiện bằng máy nghiền bi hoặc máy tương tự. Theo cách khác, quá trình xử lý chiết có thể được thực hiện bằng thiết bị chiết nhào trộn (chẳng hạn, SKN-R100, sản xuất bởi Sanyukiki Co., Ltd.) hoặc thiết bị tương tự.

Trong khi chiết, steviol glycosit có thể được chiết một cách hiệu quả hơn bằng cách gia nhiệt dung môi trong nước. Nhiệt độ trong khi chiết có thể, chẳng hạn, nằm

trong khoảng từ 0 đến 100°C, 20 đến 90°C, 40 đến 80°C, 25 đến 80°C, 30 đến 75°C, 35 đến 70°C, 40 đến 65°C hoặc 45 đến 70°C, và tốt hơn là từ 45 đến 70°C.

Quá trình chiết có thể được thực hiện không chỉ một lần, mà còn nhiều lần. Quá trình chiết được thực hiện nhiều lần để bằng cách đó chiết nhiều hơn steviol glycosit được chứa trong lá. Quá trình chiết tốt hơn là được thực hiện hai lần từ quan điểm hiệu suất.

(B) Xử lý tách rắn-lỏng

Theo một khía cạnh của phương pháp tinh chế thô của sáng chế, chất lỏng đã được làm trong có thể thu được bằng cách xử lý tách rắn-lỏng phân chiết lỏng tạo ra. Quá trình xử lý tách rắn-lỏng không bị giới hạn đặc biệt miễn là chất rắn và chất lỏng được tách phù hợp, và các ví dụ bao gồm quá trình xử lý bằng ly tâm, quá trình xử lý bằng rây, và quá trình xử lý bằng cách lọc ép.

Quá trình xử lý tách rắn-lỏng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng nhiều đơn nguyên, và chất lỏng đã được làm trong có thể thu được bằng cách, chẳng hạn, thực hiện quá trình xử lý tách rắn-lỏng thứ nhất và sau đó quá trình xử lý tách rắn-lỏng thứ hai.

Các ví dụ của quá trình xử lý tách rắn-lỏng khác với quá trình xử lý đã nêu ở trên có thể còn bao gồm quá trình xử lý bằng màng vi lọc.

(C) Xử lý keo tụ

Theo một khía cạnh của phương pháp tinh chế thô của sáng chế, chất lỏng xử lý có thể thu được bằng cách bổ sung chất kết tụ vào chất lỏng đã được làm trong thu được bằng quá trình xử lý tách rắn-lỏng. Chất kết tụ không bị giới hạn đặc biệt, và chất kết tụ vô cơ hoặc chất kết tụ polyme hữu cơ đã biết có thể được sử dụng. Theo các khía cạnh khác của sáng chế, chất kết tụ tương ứng với một hoặc nhiều chất được chọn từ nhôm sulfat, polynhôm clorua, sắt clorua (III) hoặc hydrat của chúng, chất kết tụ polyme tổng hợp (polyme cao polyacrylamit, sản phẩm hydro hóa một phần của polyacrylamit, hoặc

chất tương tự), axit alginic, chitin, chitosan, và canxi hydroxit. Một hoặc nhiều chất trong số các chất kết tụ như vậy có thể được bao gồm trong chất kết tụ, hoặc chất kết tụ khác có thể cũng bao gồm thêm trong đó. Chất kết tụ có thể được sử dụng theo cách phối hợp gồm hai hoặc nhiều loại trong số chúng, và, chẳng hạn, phối hợp của canxi hydroxit và sắt clorua, hoặc phối hợp của canxi hydroxit, sắt clorua và chitosan có thể cũng được sử dụng.

Lượng của chất kết tụ được bổ sung không bị giới hạn đặc biệt miễn là chất kết tụ được keo tụ, và chất kết tụ có thể được bổ sung với lượng, chẳng hạn, nằm trong khoảng từ 3,0 đến 50% trọng lượng dựa trên hàm lượng chất rắn hòa tan được bao gồm trong chất lỏng đã được làm trong. Chẳng hạn, canxi hydroxit có thể được bổ sung với lượng tương ứng nằm trong khoảng từ 10 đến 30% trọng lượng dựa trên hàm lượng chất rắn trong chất lỏng đã được làm trong, và có thể tốt hơn là được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 12 đến 28% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 14 đến 25% trọng lượng. Sắt clorua (III) hexahydrat có thể được bổ sung với lượng tương ứng nằm trong khoảng từ 15 đến 40% trọng lượng dựa trên hàm lượng chất rắn trong chất lỏng đã được làm trong, và có thể tốt hơn là được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 18 đến 38% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 20 đến 35% trọng lượng. Trong trường hợp của dung dịch chitosan 0,5% (trọng lượng/thể tích), dung dịch này có thể được bổ sung với lượng tương ứng nằm trong khoảng từ 3,0 đến 10% trọng lượng dựa trên hàm lượng chất rắn trong chất lỏng đã được làm trong, và có thể tốt hơn là được bổ sung với lượng từ 4,0 đến 8,0% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 4,5 đến 7,0% trọng lượng.

Độ pH trong quá trình xử lý keo tụ không bị giới hạn đặc biệt, và có thể được chọn thích hợp sao cho sự keo tụ được tối ưu hóa phụ thuộc vào loại chất kết tụ. Theo một khía cạnh của sáng chế, độ pH của chất lỏng đã được làm trong trong quá trình xử lý keo tụ có thể nằm trong khoảng từ 2,0 đến 13, 3,0 đến 13, 4,0 đến 13, 5,0 đến 13, hoặc 6,0 đến 13.

Nhiệt độ của quá trình xử lý keo tụ không bị giới hạn đặc biệt, và quá trình xử lý keo tụ có thể được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 25°C) mà không cần gia nhiệt hoặc làm nguội.

Sản phẩm keo tụ được bao gồm trong chất lỏng xử lý có thể cũng được loại bỏ sau quá trình xử lý keo tụ và trước quá trình xử lý tinh chế bằng nhựa, được mô tả dưới đây. Sản phẩm keo tụ có thể được loại bỏ bằng phương pháp bất kỳ như lọc.

Các ví dụ của phương pháp loại bỏ sản phẩm keo tụ có thể còn bao gồm ly tâm, ngoài phương pháp đã nêu ở trên.

(D) Xử lý tinh chế bằng nhựa

Theo một khía cạnh của phương pháp tinh chế thô của sáng chế, chất lỏng xử lý thu được bằng quá trình xử lý keo tụ được xử lý bằng nhựa xấp xỉ nước. Steviol glycosit có cấu trúc phân tử có nhóm ưa nước và nhóm kỵ nước và lưỡng tính, và có trọng lượng phân tử khoảng 1000. Steviol glycosit còn được biết là ổn định ở độ pH nằm trong khoảng từ 2,5 đến 9,0 và không bị ion hóa ngay cả trong điều kiện axit hoặc bazơ. Mặc khác, một lượng lớn thành phần bất kỳ khác với steviol glycosit được bao gồm trong chất lỏng xử lý thu được sau quá trình xử lý keo tụ. Mặc dù không bị ràng buộc vào bất kỳ lý thuyết nào, các thành phần bất kỳ như vậy bao gồm thành phần như ion sắt có trọng lượng phân tử khác với trọng lượng phân tử của steviol glycosit, và thành phần có thể ion hóa như các axit amin, và cho rằng các thành phần này có thể được loại bỏ bằng cách xử lý bằng nhựa xấp xỉ nước.

Steviol glycosit có trực chính steviol kỵ nước được liên kết kỵ nước và được tẩy bằng nhựa tổng hợp. Ngược lại, các tạp chất có tính ưa nước cao không gắn kết với nhựa và được chuyển đến phân đoạn đi qua và được loại bỏ, và do đó được cho là steviol glycosit có độ tinh khiết gia tăng bằng cách nạp chất lỏng xử lý thu được sau quá trình xử lý keo tụ vào cột đã được nhồi nhựa nêu trên, và sau đó thực hiện rửa bằng nước. Vì liên kết giữa steviol glycosit và nhóm chức của nhựa tổng hợp bị phân ly bởi dung môi

phân cực thấp, lợi thế là steviol glycosit có thể được thu hồi cuối cùng ở tỷ lệ sản lượng cao.

Nhựa xốp để sử dụng theo một khía cạnh của phương pháp tinh chế thô của sáng chế không bị giới hạn đặc biệt miễn là nó là nhựa xốp có ái lực với nước thấp, và tốt hơn là, chẳng hạn, nhựa xốp của một hoặc nhiều nhựa kỵ nước được chọn từ copolyme của styren và divinylbenzen, polyetylen, polypropylen, polystyren, poly(met)acrylonitril, polyamit, và polycacbonat. Theo khía cạnh được ưu tiên của sáng chế, copolyme của styren và divinylbenzen tốt hơn là không được xử lý để đưa vào nhóm trao đổi ion bất kỳ (nghĩa là, không có nhóm trao đổi ion). Nói chung, trong lúc, khi nhựa trao đổi ion được sản xuất, styren và divinylbenzen được copolyme hóa để tạo ra cấu trúc mạng lưới khối và sau đó nhóm trao đổi ion được đưa vào trong nhựa, “không được xử lý để đưa vào nhóm trao đổi ion bất kỳ” có nghĩa là quá trình xử lý như vậy không được thực hiện.

Theo một khía cạnh của phương pháp tinh chế thô của sáng chế, nhựa xốp kỵ nước có nhóm kỵ nước, và nhóm kỵ nước chứa một hoặc nhiều nhóm được chọn từ nhóm aryl, nhóm alkyl, nhóm alkylsilyl, nhóm este và nhóm epoxy. Miễn là một hoặc nhiều nhóm kỵ nước được chọn từ đó được chứa, nhóm kỵ nước khác bất kỳ có thể cũng được chứa thêm. Các ví dụ của nhóm aryl bao gồm nhóm phenyl, nhóm benzyl, nhóm tolyl, và nhóm xylyl, và các ví dụ của nhóm alkyl bao gồm các nhóm alkyl C1 đến 20 như nhóm metyl, nhóm etyl, nhóm propyl, nhóm butyl, nhóm pentyl, và nhóm octadexyl.

Theo khía cạnh được ưu tiên của phương pháp tinh chế thô của sáng chế, bán kính lỗ xốp thường xuyên nhất của nhựa xốp kỵ nước nằm trong khoảng từ 10 đến 200Å. Theo khía cạnh được ưu tiên, bán kính lỗ xốp thường xuyên nhất nằm trong khoảng từ 10 đến 150Å, 15 đến 100Å, hoặc 20 đến 80Å. Cho rằng các đặc tính xốp như vậy được thể hiện để bằng cách đó cho phép steviol glycosit hấp thụ một cách hiệu quả vào các lỗ và được tách một cách hiệu quả ra khỏi các thành phần khác.

Chất lỏng xử lý có thể cũng được xử lý bằng nhựa trao đổi anion trước khi quá trình xử lý bằng nhựa xốp kỵ nước được thực hiện. Quá trình xử lý bằng nhựa trao đổi anion như vậy có thể được thực hiện trước để bằng cách đó loại bỏ một cách hiệu quả thành phần gắn kết với nhựa kỵ nước, như thuốc nhuộm và/hoặc catechin. Nhựa trao đổi anion như vậy không bị giới hạn đặc biệt, các ví dụ của nó bao gồm nhựa trao đổi anion bazơ, và nhựa trao đổi anion bazơ như vậy được sử dụng ở đây có thể là, chẳng hạn, nhựa trao đổi anion bazơ yếu trong đó nhóm amino bậc một đến bậc hai được đưa vào làm nhóm chức, hoặc nhựa trao đổi anion bazơ mạnh có nhóm amoni bậc bốn (chẳng hạn, nhóm trimetylamoni hoặc nhóm dimetyletanol amoni).

(E) Xử lý cô đặc

Dung dịch thu được sau quá trình tinh chế bằng nhựa có thể được xử lý cô đặc thêm nữa để loại bỏ dung môi trong nước. Quá trình xử lý như vậy không bị giới hạn đặc biệt, và các ví dụ của nó bao gồm phương pháp làm bay hơi dung môi trong nước bằng cách gia nhiệt, hoặc phương pháp loại bỏ dung môi trong nước bằng cách làm khô dưới áp suất giảm.

Sau khi xử lý cô đặc, quá trình sấy phun có thể cũng được thực hiện. Trong các điều kiện nhiệt độ thông thường của quá trình sấy phun, nhiệt độ đầu vào khoảng từ 120 đến 200°C và nhiệt độ đầu ra khoảng từ 80 đến 120°C.

Sản phẩm tinh chế thô

Sản phẩm tinh chế thô để sử dụng theo phương pháp sản xuất của sáng chế bao gồm tổng steviol glycosit với lượng nằm trong khoảng từ 50 đến 95% khối lượng dựa trên tổng trọng lượng của sản phẩm tinh chế thô, và thích hợp là bao gồm tổng steviol glycosit với lượng bất kỳ (% khối lượng) nằm trong khoảng từ 55 đến 95, 60 đến 95, 70 đến 95, 80 đến 95, 90 đến 95, 50 đến 90, 50 đến 80, 50 đến 70, 50 đến 65, 50 đến 60, 55 đến 90, 55 đến 80, 55 đến 70, 55 đến 60, 60 đến 70, 60 đến 80, 50 đến 94, 55 đến 94, và 60 đến 94.

Trong bản mô tả này, tổng steviol glycosit thích hợp bao gồm bảy loại steviol glycosit bao gồm RebA, RebB, RebC, RebD, steviosit, RebF và RebM. Trong bản mô tả này, tổng steviol glycosit có thể được viết tắt là “TSG”.

Sản phẩm tinh chế thô bao gồm ít nhất RebA và RebD. Thích hợp là, hàm lượng của RebA (% khối lượng) là hàm lượng bất kỳ nằm trong khoảng từ 5 đến 70, 15 đến 70, 20 đến 70, 25 đến 70, 35 đến 70, 45 đến 70, 55 đến 70, 65 đến 70, 5 đến 65, 5 đến 45, 5 đến 25, 15 đến 65, 25 đến 45, 40 đến 75, và 45 đến 65, và hàm lượng của RebD (% khối lượng) là hàm lượng bất kỳ nằm trong khoảng từ 1 đến 70, từ 2 đến 70, 5 đến 70, 15 đến 70, 25 đến 70, 35 đến 70, 45 đến 70, 55 đến 70, 65 đến 70, 1 đến 65, 1 đến 45, 1 đến 25, 2 đến 65, từ 2 đến 45, 2 đến 25, 5 đến 65, 5 đến 45, 5 đến 25, 15 đến 65, 25 đến 45, 40 đến 75, 45 đến 65, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 1 đến 8, 2 đến 20, từ 2 đến 15, từ 2 đến 10, và 2 đến 8, trong sản phẩm tinh chế thô.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, hàm lượng của RebA nằm trong khoảng từ 1 đến 30% khối lượng và hàm lượng của RebD là hàm lượng bất kỳ nêu trên, trong sản phẩm tinh chế thô.

Điều chế dung dịch dùng để kết tinh

Sau đó, dung môi được cho vào dụng cụ chứa bất kỳ, chẳng hạn, tinh thể có thể được cung cấp, cùng với cánh khuấy, và sản phẩm tinh chế thô được trộn trong dung môi, để điều chế dung dịch dùng để kết tinh. Trong lúc độ siêu bão hòa của RebA (10°C) được đặt trong một khoảng cụ thể sao cho RebA không được tạo thành tinh thể, độ siêu bão hòa của RebD (10°C) được đặt trong một khoảng cụ thể. Sản phẩm tinh chế thô sau đó được trộn trong dung môi với lượng sao cho đạt được các độ siêu bão hòa như vậy.

Độ siêu bão hòa (10°C) có nghĩa là độ siêu bão hòa trong trường hợp 10°C là nhiệt độ chuẩn. Điều đó không có nghĩa là cần làm nguội ở 10°C.

Độ siêu bão hòa được biểu diễn bằng công thức sau đây.

$$\sigma = (C - C^*)/C^*$$

Trong công thức này, σ là độ siêu bão hòa, C là tỷ lệ của lượng chất được bổ sung vào dung môi (ppm), và C^* là nồng độ hòa tan bão hòa (ppm).

Lý do vì sao C ở đây không phải đơn giản là “nồng độ của chất”, mà là “tỷ lệ của lượng chất được bổ sung vào dung môi” là vì trường hợp được mong đợi tại đó chất được bổ sung không được hòa tan hoàn toàn và ở trạng thái lơ lửng. Tỷ lệ của lượng được bổ sung vào dung môi, ở đây được chấp nhận là tiêu chuẩn của độ siêu bão hòa bất kể có hoặc không có sự hòa tan của chất được bổ sung và mức độ của nó.

Mầm tinh thể có thể được sử dụng theo sáng chế, nhưng lượng của mầm tinh thể được bổ sung không liên quan đến việc tính độ siêu bão hòa.

Độ hòa tan bão hòa ở đây được đo theo phương pháp sau đây. Nghĩa là, 100ml dung môi có nồng độ metanol hoặc etanol đã được xác định trước (trọng lượng/trọng lượng) được cho vào trong dụng cụ chứa (có thể tích 100ml hoặc 200ml, thích hợp là 200ml), nhiệt độ chất lỏng được đặt đến 10°C bằng chậu nước trước, và sau đó dung môi được khuấy ở 200 vòng/phút (round per minute, rpm), và chất đích được nạp với lượng dư (lượng cho tới khi tạo ra huyền phù). Sau 24 giờ, phần lọc thu được bằng bộ lọc màng 0,45-um, và lượng chất đích (RebA hoặc RebD) được bao gồm trong phần lọc được đo bằng thiết bị sắc ký lỏng phổ khối (liquid chromatography mass spectrometry, LCMS). LCMS được sử dụng ở đây thích hợp là LCMS 8050 sản xuất bởi Shimadzu Corporation.

Độ siêu bão hòa của RebD (10°C) lớn hơn hoặc bằng 10, và thích hợp là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 10 đến 200, 10 đến 180, 10 đến 160, 10 đến 140, 10 đến 120, 10 đến 100, 10 đến 80, 10 đến 60, 10 đến 40, 10 đến 20, 15 đến 200, 35 đến 200, 55 đến 200, 75 đến 200, 95 đến 200, 115 đến 200, 135 đến 200, 155 đến 200, 175 đến 200, 15 đến 180, 15 đến 160, 15 đến 140, 15 đến 120, 15 đến 100, 15 đến 80, 15 đến 60, 15 đến 40, 15 đến 20, 20 đến 180, 20 đến 160, 20 đến 140, 20 đến 120, 20 đến 100, 20 đến 80, 20 đến 60, 20 đến 40, 80 đến 180, 80 đến 160, 80 đến 140, 80 đến 120, 80 đến

100, 100 đến 180, 100 đến 160, 100 đến 140, và 100 đến 120.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, độ siêu bão hòa của RebD (10°C) nằm trong khoảng từ 10 đến 350, 20 đến 350, 50 đến 350, 10 đến 300, 20 đến 300, 50 đến 300, 10 đến 205, hoặc 20 đến 205.

Độ siêu bão hòa của RebA (10°C) nhỏ hơn hoặc bằng 18 và bao gồm nhỏ hơn hoặc bằng 0. Theo một khía cạnh của sáng chế, độ siêu bão hòa của RebA (10°C) lớn hơn 0 và nhỏ hơn hoặc bằng 18. Thích hợp hơn nữa là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 3 đến 18, 3 đến 13, 3 đến 8, 5 đến 18, 7 đến 18, 9 đến 18, 11 đến 18, 13 đến 18, 15 đến 18, 17 đến 18, 5 đến 13, 7 đến 11, 5 đến 15, 7 đến 15, 9 đến 15, 11 đến 15, và 13 đến 15.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, độ siêu bão hòa của RebA (10°C) là giá trị bất kỳ nhỏ hơn hoặc bằng 16, nằm trong khoảng từ -1 đến 16, và 0 đến 16.

RebA khó được kết tủa và RebD được kết tủa dễ dàng trong điều kiện tại đó độ siêu bão hòa của RebA thấp và độ siêu bão hòa của RebD cao. Trong trường hợp ở đó cả độ siêu bão hòa của RebA và RebD (10°C) nằm trong các khoảng nêu trên và độ siêu bão hòa của RebA lớn hơn 0, tỷ lệ σ_D/σ_A của độ siêu bão hòa σ_D của RebD với độ siêu bão hòa σ_A của RebA tốt hơn là giá trị bất kỳ lớn hơn hoặc bằng 4, lớn hơn hoặc bằng 5, nằm trong khoảng từ 4 đến 40, 5 đến 40, 7 đến 40, 12 đến 40, 17 đến 40, 22 đến 40, 27 đến 40, 32 đến 40, 37 đến 40, 4 đến 30, 5 đến 30, 7 đến 30, 12 đến 30, 17 đến 30, 22 đến 30, 27 đến 30, 4 đến 35, 5 đến 35, 8 đến 35, 13 đến 35, 18 đến 35, 23 đến 35, 28 đến 35, 33 đến 35, 8 đến 25, 13 đến 25, 18 đến 25, 23 đến 25, 10 đến 40, 15 đến 40, 20 đến 40, 25 đến 40, 30 đến 40, 35 đến 40, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, và 25 đến 30.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, σ_D/σ_A là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 4 đến 1000000, 5 đến 1000000, 4 đến 750000, và 5 đến 750000.

Dung môi để sử dụng trong việc điều chỉnh dung dịch dùng để kết tinh là dung môi metanol hoặc etanol. Dung dịch metanol trong nước hoặc dung dịch etanol trong

nước là thích hợp. Dung dịch etanol trong nước là thích hợp hơn. Không sử dụng dung môi metanol, nhưng việc sử dụng dung môi etanol là đặc biệt thích hợp. “Không sử dụng dung môi metanol, nhưng việc sử dụng dung môi etanol” có nghĩa là nồng độ metanol của dung môi thích hợp là nhỏ hơn hoặc bằng 1mg/l, thích hợp hơn là nhỏ hơn hoặc bằng 0,5mg/l, đặc biệt thích hợp là nhỏ hơn hoặc bằng 0,1mg/l. Giới hạn dưới của nồng độ metanol là 0mg/l. Etanol thân thiện với môi trường hơn và ảnh hưởng lên cơ thể con người cũng thấp hơn, so với metanol. Trong lúc việc sử dụng metanol cần phải lắp đặt hệ thống thông gió và thiết lập khả năng thông gió trong cơ sở sản xuất, và thực hiện việc kiểm tra y tế đặc biệt cho người sử dụng, theo luật, việc sử dụng etanol có lợi thế lớn về mặt ứng dụng công nghiệp vì không cần thực hiện các việc nêu trên.

Lượng của sản phẩm tinh chế thô được bổ sung được đặt thích hợp sao cho độ siêu bão hòa nằm trong khoảng đã nêu ở trên, và sản phẩm tinh chế thô được trộn thích hợp với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 30% khối lượng, thích hợp hơn là lượng tương ứng với lượng bất kỳ (% khối lượng) trên mỗi dung môi nằm trong khoảng từ 1 đến 25, 1 đến 20, 1 đến 15, 1 đến 10, 5 đến 30, 5 đến 25, 5 đến 20, 5 đến 15, 5 đến 10, 10 đến 30, 15 đến 30, 20 đến 30, 25 đến 29, 10 đến 25, và 15 đến 20.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, lượng của sản phẩm tinh chế thô được bổ sung, trên mỗi dung môi, nằm trong khoảng từ 1 đến 28% khối lượng, 1 đến 6% khối lượng, 6 đến 25% khối lượng, hoặc 6 đến 28% khối lượng.

Lượng của sản phẩm tinh chế thô được bổ sung được đặt thích hợp sao cho độ siêu bão hòa nằm trong khoảng đã nêu ở trên, và sản phẩm tinh chế thô được bổ sung thích hợp với lượng sao cho lượng của RebD trên mỗi dung môi là lượng bất kỳ (% khối lượng) nằm trong khoảng từ 0,15 đến 3,50, 0,30 đến 3,50, 0,45 đến 3,50, 0,60 đến 3,50, 0,75 đến 3,50, 0,90 đến 3,50, 1,05 đến 3,50, 1,20 đến 3,50, 1,50 đến 3,50, 1,80 đến 3,50, 2,10 đến 3,50, 2,40 đến 3,50, 2,70 đến 3,50, 3,00 đến 3,50, 0,15 đến 3,00, 0,30 đến 3,00, 0,45 đến 3,00, 0,60 đến 3,00, 0,75 đến 3,00, 0,90 đến 3,00, 1,05 đến 3,00, 1,20 đến 3,00,

1,50 đến 3,00, 1,80 đến 3,00, 2,10 đến 3,00, 2,40 đến 3,00, 2,70 đến 3,00, 0,15 đến 2,50, 0,15 đến 2,00, 0,15 đến 1,50, 0,15 đến 1,00, 0,15 đến 0,70, 0,15 đến 0,40, 0,30 đến 2,50, 0,45 đến 2,00, 0,60 đến 1,50, và 0,75 đến 1,00.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, sản phẩm tinh chế thô được bổ sung với lượng sao cho lượng của RebD trên mỗi dung môi là lượng bất kỳ (% khối lượng) nằm trong khoảng từ 0,20 đến 3,50 và 0,25 đến 3,50.

Nồng độ của dung môi chứa metanol hoặc etanol (% khối lượng) thích hợp là nhỏ hơn hoặc bằng 99,9% khối lượng, thích hợp hơn là nhỏ hơn hoặc bằng 92% khối lượng. Theo một khía cạnh của sáng chế, nồng độ này là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 50 đến 99, 60 đến 99, 70 đến 99, 80 đến 99, 90 đến 99, 50 đến 89, 60 đến 79, 50 đến 92, 60 đến 92, 70 đến 92, 80 đến 92, 90 đến 92, 50 đến 82, 60 đến 72, 70 đến 90, 80 đến 90, và 70 đến 80% khối lượng.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, nồng độ của dung môi chứa metanol hoặc etanol (% khối lượng) là giá trị bất kỳ lớn hơn hoặc bằng 73% khối lượng và nhỏ hơn 95% khối lượng, và nằm trong khoảng từ 73 đến 92% khối lượng.

Khi sản phẩm tinh chế thô được trộn trong dung môi, nhiệt độ chất lỏng (°C) của dung môi tốt hơn là được giữ ở giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 40 đến 80, 42 đến 80, 44 đến 80, 46 đến 80, 48 đến 80, 50 đến 80, 52 đến 80, 57 đến 80, 62 đến 80, 67 đến 80, 72 đến 80, 40 đến 75, 40 đến 70, 40 đến 65, 40 đến 60, 40 đến 55, 40 đến 50, 42 đến 75, 44 đến 70, 46 đến 65, 48 đến 60, và 50 đến 55.

Thích hợp là, khi sản phẩm tinh chế thô được trộn trong dung môi, tốt hơn là mầm tinh thể được trộn. Mầm tinh thể được sử dụng ở đây là RebD. Kích thước của mầm tinh thể không bị giới hạn đặc biệt.

Trong trường hợp ở đó mầm tinh thể được bổ sung, nhiệt độ dung dịch tốt hơn là nhiệt độ tạo ra sự siêu bão hòa từ quan điểm tránh sự hòa tan của mầm tinh thể.

Lượng của mầm tinh thể được bổ sung có thể được xác định thích hợp phụ thuộc

vào các điều kiện khác và điều kiện tương tự, và lượng lớn hơn được bổ sung có xu hướng dẫn đến sự gia tăng hơn nữa về tỷ lệ sản lượng. Thích hợp là, tỷ lệ bổ sung mầm tinh thể Cs, được biểu diễn bằng công thức sau đây, tốt hơn là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 0,050 đến 10,000, 0,075 đến 10,000, 0,100 đến 10,000, 0,200 đến 10,000, 0,300 đến 10,000, 0,400 đến 10,000, 0,500 đến 10,000, 0,600 đến 10,000, 0,700 đến 10,000, 0,800 đến 10,000, 0,900 đến 10,000, 1,000 đến 10,000, 2,000 đến 10,000, 3,000 đến 10,000, 4,000 đến 10,000, 5,000 đến 10,000, 6,000 đến 10,000, 7,000 đến 10,000, 8,000 đến 10,000, 0,050 đến 9,000, 0,050 đến 8,000, 0,050 đến 7,000, 0,050 đến 6,000, 0,050 đến 5,000, 0,050 đến 4,000, 0,050 đến 3,000, 0,050 đến 2,000, 0,050 đến 1,000, 0,050 đến 0,700, 0,050 đến 0,400, 0,050 đến 0,100, 0,075 đến 9,000, 0,100 đến 8,000, 0,200 đến 7,000, 0,300 đến 6,000, 0,400 đến 5,000, 0,500 đến 4,000, 0,600 đến 3,000, 0,700 đến 2,000, 0,800 đến 1,000, 5,500 đến 9,500, 6,500 đến 9,500, 7,500 đến 9,500, 8,500 đến 9,500, 5,500 đến 8,500, và 6,500 đến 7,500.

$$Cs = Ws/W_{th}$$

Trong công thức này, Ws là lượng của mầm tinh thể (đơn vị: g), và W_{th} là sản lượng kỳ vọng (đơn vị: g).

$$W_{th} = (C - C^*)/1000000 \times \text{Lượng của dung môi}$$

Trong công thức này, C là tỷ lệ của lượng của RebD được bổ sung vào dung môi (ppm), và

C* là độ hòa tan bão hòa (đơn vị: ppm).

Đơn vị của lượng dung môi là ml.

C không bao gồm lượng của mầm tinh thể.

Kết tủa

RebD được kết tủa bằng cách làm nguội dung dịch dùng để kết tinh bằng cách khuấy trộn trong thiết bị kết tinh bất kỳ, chẳng hạn, thiết bị kết tinh như thiết bị kết tinh

quay hình trụ.

Quá trình làm nguội, nếu được thực hiện nhanh, có thể làm cho sản phẩm kết tinh với độ tinh khiết thấp của RebD cần thu được hoặc có thể dẫn đến tỷ lệ sản lượng không tăng, và do đó quá trình làm nguội tốt hơn là được thực hiện từ từ. Tốc độ làm nguội ($^{\circ}\text{C}/\text{phút}$) thích hợp là lớn hơn hoặc bằng $0,002^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, và thích hợp hơn là nằm trong khoảng từ $0,002$ đến $1,37^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, cụ thể, giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ $0,002$ đến $1,37$, $0,002$ đến $0,87$, $0,002$ đến $0,37$, $0,002$ đến $0,27$, $0,002$ đến $0,17$, $0,002$ đến $0,07$, $0,002$ đến $0,04$, $0,002$ đến $0,01$, $0,002$ đến $0,007$, $0,007$ đến $1,37$, $0,017$ đến $1,37$, $0,027$ đến $1,37$, $0,057$ đến $1,37$, $0,087$ đến $1,37$, $0,387$ đến $1,37$, $0,687$ đến $1,37$, $0,987$ đến $1,37$, $0,007$ đến $0,87$, $0,017$ đến $0,37$, $0,027$ đến $0,27$, và $0,057$ đến $0,17$.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, tốc độ làm nguội ($^{\circ}\text{C}/\text{phút}$) nằm trong khoảng từ $0,02$ đến $0,2$.

Thời gian khuấy trộn và làm nguội (đơn vị: giờ) có thể được đặt thích hợp phụ thuộc vào các điều kiện khác, chẳng hạn, có hay không mầm tinh thể được sử dụng, và tốt hơn là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 1 đến 48 , 6 đến 48 , 11 đến 48 , 16 đến 48 , 21 đến 48 , 26 đến 48 , 31 đến 48 , 36 đến 48 , 41 đến 48 , 46 đến 48 , 1 đến 43 , 1 đến 38 , 1 đến 33 , 1 đến 28 , 1 đến 23 , 1 đến 18 , 1 đến 13 , 1 đến 8 , 1 đến 3 , 6 đến 43 , 11 đến 38 , 16 đến 33 , và 21 đến 28 , từ quan điểm gia tăng tỷ lệ sản lượng.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, thời gian khuấy trộn và làm nguội (đơn vị: giờ) nằm trong khoảng từ 6 đến 24 giờ, lớn hơn hoặc bằng 12 giờ, hoặc từ 12 đến 24 giờ.

Nhiệt độ làm nguội ($^{\circ}\text{C}$) trong bước kết tủa được xác định thích hợp phụ thuộc vào các điều kiện khác, chẳng hạn, liệu có hay không mầm tinh thể được sử dụng, và nhiệt độ làm nguội là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 3 đến 40 , 6 đến 40 , 9 đến 40 , 12 đến 40 , 15 đến 40 , 18 đến 40 , 21 đến 40 , 24 đến 40 , 27 đến 40 , 30 đến 40 , 33 đến 40 , 20 đến 40 , nhỏ hơn hoặc bằng 35°C , nằm trong khoảng từ 3 đến 35 , 6 đến 35 , 9 đến 35 ,

12 đến 35, 15 đến 35, 18 đến 35, 21 đến 35, 24 đến 35, 27 đến 35, 30 đến 35, và 25 đến 35 là được ưu tiên.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, quá trình làm nguội được thực hiện đến nhiệt độ làm nguội ($^{\circ}\text{C}$) nằm trong khoảng từ 9 đến 20°C , 9 đến 17°C , 4 đến 20°C hoặc 4 đến 17°C .

Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$) ở thời điểm làm nguội tốt hơn là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 30 đến 85, 40 đến 85, 50 đến 85, 60 đến 85, 70 đến 85, 30 đến 80, 30 đến 70, 30 đến 60, 30 đến 50, 30 đến 40, 40 đến 80, 40 đến 70, và 40 đến 60.

Tốc độ khuấy trộn (rpm) tốt hơn là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 5 đến 600, 5 đến 500, 5 đến 400, 5 đến 300, 5 đến 200, 5 đến 100, 5 đến 50, 5 đến 20, 55 đến 600, 105 đến 600, 155 đến 600, 205 đến 600, 255 đến 600, 305 đến 600, 355 đến 600, 405 đến 600, 455 đến 600, 505 đến 600, 555 đến 600, 50 đến 600, 200 đến 600, 350 đến 600, 500 đến 600, 100 đến 450, 100 đến 300, 100 đến 150, 200 đến 500, và 300 đến 400.

Bước sau

Chế phẩm rắn bao gồm RebD kết tủa được tách ra từ pha lỏng bằng cách ly tâm, lọc, hoặc cách tương tự, và RebD sau khi tách được làm khô. Bộ phận tách không bị giới hạn đặc biệt miễn là chất rắn và chất lỏng được tách một cách phù hợp, và các ví dụ bao gồm xử lý bằng thiết bị ly tâm, xử lý bằng bộ lọc màng, và xử lý bằng rây. Bề mặt có thể, nếu cần, được rửa bằng cách phun tinh thể RebD bằng một lượng nhỏ của dung môi giống như dung môi được sử dụng trong quá trình kết tinh hoặc loại tương tự, sau khi tách và trước khi làm khô.

Khác

Nước cái sau quá trình xử lý tách rắn-lỏng có thể được sử dụng trong quá trình kết tinh của các thành phần khác như RebA và RebM.

Theo một khía cạnh của phương pháp sản xuất của sáng chế, bước tinh chế thô, bước điều chế dung dịch dùng để kết tinh, bước kết tủa và bước sau đã nêu ở trên có thể

mỗi bước được thực hiện một lần khi hoàn thành quá trình sản xuất (kết tinh đơn), từ quan điểm là tỷ lệ sản lượng được nhân mạnh hơn độ tinh khiết. Theo các khía cạnh khác, các bước từ bước điều chế dung dịch dùng để kết tinh đến bước sau có thể được lặp lại nhiều lần (kết tinh nhiều lần) để tăng hơn nữa độ tinh khiết của sản phẩm kết tinh chứa RebD. Kết tinh kép là được ưu tiên từ quan điểm sự cân bằng giữa tỷ lệ sản lượng và độ tinh khiết.

Kết tinh kép

Trong trường hợp ở đó quá trình kết tinh kép được thực hiện, sản phẩm kết tinh chứa RebD có thể thu được bằng cách thực hiện các bước từ bước tinh chế thô đến bước kết tủa để tách và làm khô rebaudiosit D kết tủa, để thu được sản phẩm kết tinh sơ cấp, sau đó trộn sản phẩm kết tinh sơ cấp, thay cho sản phẩm tinh chế thô, trong dung môi chứa metanol hoặc etanol sao cho độ siêu bão hòa ở 10°C của rebaudiosit D lớn hơn hoặc bằng 10 và độ siêu bão hòa ở 10°C của rebaudiosit A nhỏ hơn hoặc bằng 18, để điều chế chất lỏng hòa tan sản phẩm kết tinh sơ cấp, làm nguội chất lỏng hòa tan sản phẩm kết tinh sơ cấp, thay cho dung dịch dùng để kết tinh, bằng cách khuấy trộn, để kết tủa RebD, và tách và làm khô RebD kết tủa. Quy trình và các điều kiện trong quá trình kết tinh kép có thể giống như đã nêu ở trên quy trình kết tinh và các điều kiện kết tinh. Trong trường hợp này, “sản phẩm tinh chế thô” trong phần mô tả ở trên được đọc là “sản phẩm kết tinh sơ cấp”.

Trong quá trình kết tinh kép, nồng độ của dung môi chứa metanol hoặc etanol để sử dụng trong quá trình điều chế dung dịch dùng để kết tinh có thể thấp so với trường hợp kết tinh đơn, để dẫn đến sự gia tăng hơn nữa về độ tinh khiết. Độ siêu bão hòa của RebA trong quá trình kết tinh thứ hai có thể được đặt thấp hơn so với độ siêu bão hòa của RebA trong quá trình kết tinh thứ nhất.

Theo sáng chế, quá trình kết tinh có thể được thực hiện bất kỳ lúc nào, nhưng quá trình tinh chế ở độ tinh khiết đủ cao có thể được thực hiện ngay cả bằng cách thực

hiện quá trình kết tinh hai lần hoặc ít hơn. Do đó, có các lợi thế khác gồm giảm mức giảm, rút ngắn thời gian chu trình, tiết kiệm năng lượng, và tương tự.

Sản phẩm kết tinh chứa RebD

Sản phẩm kết tinh chứa RebD (dưới đây, đôi khi được gọi là “sản phẩm kết tinh chứa RebD của sáng chế”) thu được theo phương pháp của sáng chế chứa một lượng lớn RebD. Thích hợp là, tỷ lệ của RebD với TSG trong sản phẩm kết tinh chứa RebD của sáng chế (% khối lượng) là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 35 đến 99, 45 đến 99, 55 đến 99, 65 đến 99, 75 đến 99, 85 đến 99, 35 đến 89, 35 đến 79, 35 đến 69, 35 đến 59, 35 đến 95, 45 đến 95, 55 đến 95, 65 đến 95, 75 đến 95, 85 đến 95, 40 đến 99, 50 đến 99, 60 đến 99, 70 đến 99, 80 đến 99, 90 đến 99, 40 đến 99, 40 đến 89, 40 đến 79, 40 đến 69, 40 đến 59, 50 đến 89, 60 đến 79, 40 đến 95, 50 đến 95, 60 đến 95, 70 đến 95, 80 đến 95, 90 đến 95, 40 đến 85, 40 đến 75, 40 đến 65, 40 đến 55, 50 đến 85, và 60 đến 75.

Hàm lượng của RebA trong sản phẩm kết tinh chứa RebD của sáng chế thấp. Thích hợp là, tỷ lệ của RebA với TSG (% khối lượng) là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 5 đến 80, 5 đến 50, 10 đến 50, 20 đến 50, 30 đến 50, 40 đến 50, 10 đến 40, 20 đến 40, 20 đến 30, 30 đến 40, 10 đến 30, 10 đến 20, 12 đến 18, 5 đến 30, 5 đến 20, và 5 đến 10 trong điều kiện tại đó tỷ lệ của RebD nằm trong khoảng số bất kỳ nêu trên.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, tỷ lệ của RebA với TSG (% khối lượng) nằm trong khoảng từ 3,5 đến 80, 3,5 đến 35, 3,5 đến 30 hoặc 3,5 đến 12.

Theo phương pháp của sáng chế, RebD có thể được kết tinh ở tỷ lệ sản lượng cao. Thích hợp là, tỷ lệ RebD kết tinh với RebD bao gồm trong sản phẩm tinh chế thô, trong trường hợp kết tinh đơn (% khối lượng) là giá trị bất kỳ nằm trong khoảng từ 70 đến 99, 75 đến 99, 80 đến 99, 85 đến 99, 90 đến 99, 70 đến 94, 70 đến 89, 70 đến 84, 70 đến 79, 70 đến 74, 75 đến 94, 80 đến 89, 50 đến 99, 55 đến 99, 60 đến 99, 65 đến 99, 50 đến 94, 50 đến 89, 50 đến 84, 50 đến 79, 50 đến 74, 50 đến 69, 55 đến 94, 60 đến 89, và 65 đến 84.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, tỷ lệ RebD kết tinh với RebD bao gồm trong sản phẩm tinh chế thô, trong trường hợp kết tinh đơn (% khối lượng) nằm trong khoảng từ 39 đến 85, thích hợp hơn là 39 đến 82.

Tỷ lệ thu hồi (đôi khi được gọi là “tổng tỷ lệ sản lượng”) của RebD cho tới khi hoàn thành quá trình kết tinh từ khi chiết lá cũng cao, và thích hợp là nằm trong khoảng từ 35 đến 90, 45 đến 90, 55 đến 90, 65 đến 90, hoặc 75 đến 90% khối lượng.

Tỷ lệ (% khối lượng) của TSG trong sản phẩm kết tinh chứa RebD của sáng chế thích hợp là nằm trong khoảng từ 50 đến 99, 60 đến 99, 70 đến 99, 80 đến 99, 90 đến 99, 50 đến 90, 50 đến 70, 50 đến 60, 60 đến 80, 60 đến 90, 60 đến 70, hoặc 70 đến 80.

Theo một khía cạnh khác, thích hợp là tỷ lệ của TSG trong sản phẩm kết tinh chứa RebD của sáng chế (% khối lượng) lớn hơn hoặc bằng 50, lớn hơn hoặc bằng 60, lớn hơn hoặc bằng 70 hoặc lớn hơn hoặc bằng 75.

Theo một khía cạnh của sáng chế, trong trường hợp sử dụng dung môi etanol và không sử dụng bất kỳ dung môi metanol nào ở thời điểm sản xuất, lượng metanol được bao gồm trong sản phẩm kết tinh chứa RebD nhỏ, thích hợp là nhỏ hơn 10 ppm, đặc biệt thích hợp là nhỏ hơn 5ppm, thích hợp nhất là nhỏ hơn hoặc bằng 2ppm. Hàm lượng metanol có thể được đo bằng phương pháp sắc ký khí phổ khối Headspace (Headspace gas chromatography mass spectrometry, Headspace GCMS). Giá trị giới hạn dưới tốt hơn là bằng 1ppm.

Theo một khía cạnh được ưu tiên khác, trong trường hợp sử dụng dung môi etanol và không sử dụng bất kỳ dung môi metanol nào ở thời điểm sản xuất, giá trị giới hạn dưới của lượng metanol được bao gồm trong sản phẩm kết tinh chứa RebD bằng 0ppm.

Theo một khía cạnh của sáng chế, trong trường hợp sử dụng dung môi etanol và không sử dụng dung môi metanol nào ở thời điểm sản xuất, tỷ lệ MeOH/EtOH của metanol với etanol được chứa trong sản phẩm kết tinh chứa RebD của sáng chế cũng là

giá trị thấp. Tỷ lệ này thích hợp là nằm trong khoảng từ 0,00010 đến 0,00080, thích hợp hơn là 0,00010 đến 0,00070, đặc biệt thích hợp là 0,00010 đến 0,00050, thích hợp nhất là 0,00010 đến 0,00030.

Theo một khía cạnh của sáng chế, sản phẩm kết tinh chứa RebD của sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng chế phẩm làm ngọt. Chế phẩm làm ngọt như vậy có thể bao gồm, ngoài sản phẩm kết tinh chứa RebD của sáng chế, chất làm ngọt khác với steviol glycosit. Các ví dụ của chế phẩm làm ngọt khác như vậy bao gồm các chất làm ngọt tự nhiên như fructoza, đường, đường lỏng fructoza glucoza, glucoza, maltoza, đường lỏng có hàm lượng fructoza cao, rượu đường, oligosacarit, mật ong, nước ép mía (dịch ngọt đường nâu), xi rô tinh bột, bột *Momordica grosvenori*, phần chiết *Momordica grosvenori*, bột cam thảo, phần chiết cam thảo, bột hạt *Thaumatococcus daniellii*, phần chiết hạt *Thaumatococcus daniellii*, và sucroza, và các chất làm ngọt nhân tạo như axesulfam kali, sucraloza, neotam, aspartam, và sacarin. Cụ thể, chất làm ngọt tự nhiên tốt hơn là được sử dụng, và cụ thể, fructoza, glucoza, maltoza, sucroza, hoặc đường thích hợp là được sử dụng từ quan điểm mang lại cảm giác sáng khoái, dễ uống, hương vị tự nhiên, và vị đậm đà thích hợp. Thành phần ngọt như vậy có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc ở dạng phối hợp của nhiều loại trong số chúng.

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống, chất có hương thơm và dược phẩm bao gồm sản phẩm kết tinh chứa RebD của sáng chế (ở đây còn được gọi tương ứng là “sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống của sáng chế”, “chất có mùi thơm của sáng chế” và “dược phẩm của sáng chế”). Sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống, chất có mùi thơm và dược phẩm của sáng chế không bị giới hạn cụ thể miễn là mỗi loại trong số chúng bao gồm sản phẩm kết tinh chứa RebD của sáng chế. Sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống ở đây có nghĩa là đồ uống và thực phẩm, và sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống có nghĩa là đồ uống theo cách tương ứng thích hợp hơn. Do đó, theo phương án nhất định, sáng chế đề xuất đồ uống hoặc thực phẩm mới.

Các lượng của tổng steviol glycosit được bao gồm trong sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống, chất có mùi thơm và dược phẩm của sáng chế (phần triệu (part per million, ppm) theo khối lượng) khác nhau phụ thuộc vào sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống cụ thể, và, trong trường hợp của đồ uống, lượng này tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 800ppm theo khối lượng, và có thể, chẳng hạn, nằm trong khoảng từ 20 đến 750, 20 đến 700, 20 đến 650, 20 đến 600, 20 đến 550, 25 đến 550, 30 đến 550, 35 đến 550, 40 đến 550, 45 đến 550, 50 đến 550, 55 đến 550, 20 đến 540, 25 đến 540, 30 đến 540, 35 đến 540, 40 đến 540, 45 đến 540, 50 đến 540, 55 đến 540, 20 đến 530, 25 đến 530, 30 đến 530, 35 đến 530, 40 đến 530, 45 đến 530, 50 đến 530, 55 đến 530, 20 đến 520, 25 đến 520, 30 đến 520, 35 đến 520, 40 đến 520, 45 đến 520, 50 đến 520, 55 đến 520, 20 đến 510, 25 đến 510, 30 đến 510, 35 đến 510, 40 đến 510, 45 đến 510, 50 đến 510, 55 đến 510, 20 đến 505, 25 đến 505, 30 đến 505, 35 đến 505, 40 đến 505, 45 đến 505, 50 đến 505, 55 đến 505, 20 đến 500, 25 đến 500, 30 đến 500, 35 đến 500, 40 đến 500, 45 đến 500, 50 đến 500, 55 đến 500, 20 đến 495, 25 đến 495, 30 đến 495, 35 đến 495, 40 đến 495, 45 đến 495, 50 đến 495, 55 đến 495, 20 đến 490, 25 đến 490, 30 đến 490, 35 đến 490, 40 đến 490, 45 đến 490, 50 đến 490, 55 đến 490, 100 đến 400, 150 đến 400, 200 đến 400, 250 đến 400, 300 đến 400, 100 đến 150, 100 đến 200, 100 đến 250, hoặc 100 đến 300. Hàm lượng được đặt trong khoảng như vậy có lợi thế là cho phép mang lại độ ngọt thích hợp. Ở đây, “ppm” có nghĩa là “phần triệu theo khối lượng”, trừ khi có quy định đặc biệt.

Sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống, chất có mùi thơm và dược phẩm của sáng chế có thể mỗi loại còn bao gồm chất làm ngọt khác với steviol glycosit. Các ví dụ của chế phẩm làm ngọt khác như vậy bao gồm các chất làm ngọt tự nhiên như fructoza, đường, đường lỏng fructoza glucoza, glucoza, maltoza, sucroza, đường lỏng có hàm lượng fructoza cao, rượu đường, oligosacarit, mật ong, nước ép mía (dịch ngọt đường nâu), xi rô tinh bột, bột Momordica grosvenori, phần chiết Momordica grosvenori, bột

cam thảo, phần chiết cam thảo, bột hạt *Thaumatococcus daniellii*, và phần chiết hạt *Thaumatococcus daniellii*, và các chất làm ngọt nhân tạo như axesulfam kali, sucraloza, neotam, aspartam, và sacarin. Cụ thể, chất làm ngọt tự nhiên tốt hơn là được sử dụng, và cụ thể, fructoza, glucoza, maltoza, sucroza, hoặc đường thích hợp là được sử dụng từ quan điểm mang lại cảm giác sảng khoái, dễ uống, hương vị tự nhiên, và vị đậm đà thích hợp. Thành phần ngọt như vậy có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc ở dạng phối hợp của nhiều loại trong số chúng.

Các ví dụ của thực phẩm của sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn đặc biệt, bánh kẹo, bánh mì và bánh mì ngọt, bột mì, mì sợi, thực phẩm từ gạo, thực phẩm chế biến từ nông/lâm sản, thực phẩm chế biến từ gia súc, thực phẩm chế biến từ thủy sản, sữa, sản phẩm sữa, chất béo và dầu/chất béo và thực phẩm chế biến từ dầu, gia vị, và các nguyên liệu thô khác của các thực phẩm.

Các ví dụ của đồ uống của sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn đặc biệt, các đồ uống có ga, các đồ uống không có ga, các đồ uống có cồn, các đồ uống không có cồn, các đồ uống có vị bia như bia và bia không cồn, các đồ uống cà phê, các đồ uống trà, các đồ uống ca cao, các đồ uống tăng lực, và các đồ uống chức năng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả cụ thể hơn dựa vào các ví dụ thử nghiệm.

Trong các ví dụ thử nghiệm sau đây, TSG có nghĩa là bảy loại bao gồm RebA, RebB, RebC, RebD, Steviosit, RebF và RebM, trừ khi có quy định đặc biệt.

Thử nghiệm quy mô nhỏ được thực hiện trước tiên trong phòng thí nghiệm để tìm kiếm các điều kiện kết tinh RebD tối ưu, và mối quan hệ giữa các điều kiện thử nghiệm khác nhau và các kết quả được nghiên cứu. Thử nghiệm quy mô nhỏ nhằm tìm ra mối quan hệ chung giữa các điều kiện và các kết quả.

Ví dụ thử nghiệm 1

Độ siêu bão hòa có tác dụng rất lớn lên hiện tượng tạo nhân và phát triển tinh

thể. Độ hòa tan của RebA dưới dạng thành phần chính của lá cỏ ngọt và RebD dưới dạng thành phần đích, trong dung môi, được đo.

Cụ thể, 100ml dung môi có nồng độ etanol đã được xác định trước (trọng lượng/trọng lượng) được cho vào trong dụng cụ chứa thủy tinh dung tích 50ml hoặc 100ml (bình đáy tròn có thể tách rời, Tokyo Rikakikai Co., Ltd.), đã được đặt đến nhiệt độ đã được xác định trước bằng chậu nước (PCC-7000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd.) trước, và sau đó khuấy trộn (SPZ-100, Tokyo Rikakikai Co., Ltd.) ở 200rpm, và RebA (J-100, Morita Kagaku Kogyo Co., Ltd.) hoặc RebD (Jining Renewal & Joint International, China) được nạp với lượng dư (lượng cho tới khi thu được huyền phù). Sau 24 giờ, phần lọc thu được bằng bộ lọc màng 0,45um, lượng của RebA hoặc RebD được bao gồm trong phần lọc được đo bằng LCMS (LCMS 8050 sản xuất bởi Shimadzu Corporation), và đường cong độ tan được tạo ra. Các kết quả được minh họa trên Fig.1. Theo Fig.1, các nồng độ hòa tan bão hòa tương ứng của RebA và RebD trong dung môi etanol 90% ở 10°C là 8250ppm và 99,3ppm.

Ví dụ thử nghiệm 2

Trong thử nghiệm này, ảnh hưởng của tỷ lệ của RebD với dung môi lên tỷ lệ thu hồi của RebD được xác nhận.

Thử nghiệm theo một hệ thành phần của RebD được thực hiện. Cụ thể, rượu không cải biến (loại 99,9% khối lượng) được sử dụng, nước được bổ sung thích hợp vào đó để điều chỉnh nồng độ etanol, và do đó dung môi etanol 50% khối lượng được điều chế. Bình đáy tròn có thể tách rời (sản xuất bởi Tokyo Rikakikai Co., Ltd.) được sử dụng để hòa tan RebD trong dung môi etanol 50% khối lượng trong các điều kiện trong bảng dưới đây. RebD ở đây được bổ sung làm mầm tinh thể với lượng sao cho tỷ lệ bổ sung mầm tinh thể so với sản lượng kỳ vọng là 0,05. Tiếp theo, bước làm nguội được thực hiện trong các điều kiện sau đây.

Các điều kiện kết tinh

Nhiệt độ ban đầu: 45°C

Nhiệt độ kết thúc: 10°C

RebD: sản xuất bởi Jining Renewal & Joint International

Tốc độ khuấy: 100rpm

Bảng 1

Mẫu RebD (g)	Dung môi (ml)	Tỷ lệ bổ sung mầm (Cs)	Mầm (g)
1,47	100	0,05	0,0665
1,17	100	0,05	0,0515
0,96	100	0,05	0,0353

Tỷ lệ bổ sung mầm tinh thể được tính theo công thức sau đây.

$$C_s = W_s / W_{th}$$

Trong công thức này, W_s là lượng của mầm tinh thể (đơn vị: g), W_{th} là sản lượng kỳ vọng (g), và C_s là tỷ lệ bổ sung mầm tinh thể (không có thứ nguyên).

$$W_{th} = (C - C^*) / 1,000,000 \times \text{Lượng dung môi}$$

Trong công thức này, C là tỷ lệ của lượng (ngoại trừ lượng của mầm tinh thể) của RebD được bổ sung vào dung môi (ppm), và C^* là độ hòa tan bão hòa (ppm). Đơn vị của lượng dung môi là ml.

Tiếp theo, tinh thể thu được bằng cách thực hiện quá trình tách rắn-lỏng. Bộ lọc để sử dụng trong quá trình tách rắn-lỏng là bộ lọc màng 0,45um sản xuất bởi Advantec Co., Ltd.

Sau đó, tinh thể RebD được rửa bằng etanol 99% khối lượng. Tinh thể sau khi rửa được làm khô ở 50°C.

Các kết quả được minh họa trên Fig.2. Nhận thấy rằng tỷ lệ thu hồi (lượng của RebD thu hồi được, so với lượng của RebD được sử dụng (bao gồm cả mầm tinh thể)) bằng khoảng 75% được thể hiện ngay cả ở tỷ lệ bất kỳ.

Ví dụ thử nghiệm 3

Trong thử nghiệm này, ảnh hưởng của nồng độ etanol để sử dụng làm dung môi lên tỷ lệ thành phần và sản lượng TSG (tổng steviol glycosit) của sản phẩm kết tinh RebD được nghiên cứu.

Sản phẩm tinh chế thô có tỷ lệ thành phần sau đây (đơn vị: % khối lượng) được điều chế. Độ tinh khiết của RebD trên TSG trong sản phẩm tinh chế thô bằng 1,8% khối lượng. Hàm lượng TSG trong sản phẩm tinh chế thô là 59,7% khối lượng.

Bảng 2

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM	Chất khác
22,2	1,9	7,2	1,1	25,2	1,5	0,7	40,3

Lượng sau đây của sản phẩm tinh chế thô được hòa tan với nồng độ và lượng dung môi etanol (78°C) sau đây.

Tiếp theo, quá trình làm nguội được thực hiện trong các điều kiện profin nhiệt độ và khuấy trộn sau đây, để lắng đọng tinh thể RebD. Bình đáy tròn có thể tách rời (sản xuất bởi Tokyo Rikakikai Co., Ltd.) được sử dụng để lắng đọng. Rượu không cải biến (loại 99,9% khối lượng) được sử dụng làm etanol, và nước được bổ sung thích hợp vào đó để điều chỉnh nồng độ etanol. Ở đây, tỷ lệ của RebD với dung môi bằng 0,25% khối lượng, tỷ lệ của TSG với dung môi bằng 13,8% khối lượng, độ siêu bão hòa σ_A của RebA (10°C) bằng 5,10 (khi sử dụng dung môi etanol 90,50% khối lượng), độ siêu bão hòa σ_D của RebD (10°C) bằng 24,37 (khi sử dụng dung môi etanol 90,50% khối lượng), và σ_D/σ_A bằng 4,78 (khi sử dụng dung môi etanol 90,50% khối lượng).

Công thức tính độ siêu bão hòa là như sau. Nồng độ ban đầu (tỷ lệ của lượng chất được bổ sung vào dung môi) không bao gồm lượng của mầm tinh thể.

$$\sigma = (\text{Nồng độ ban đầu} - \text{Độ tan bão hòa ở } 10^\circ\text{C}) / (\text{Độ tan bão hòa ở } 10^\circ\text{C})$$

Bảng 3

Các thông số của quá trình kết tinh sơ cấp	
Mẫu	Sản phẩm được tinh chế thô 250g
Dung môi	EtOH 95,0% khối lượng, 90,5% khối lượng, 81,40% khối lượng, 72,30% khối lượng, 1100ml
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	78°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C
Thời gian	12 giờ
Tốc độ khuấy trộn	600rpm
Profin nhiệt độ	có kiểm soát
Mầm tinh thể	-

Tiếp theo, tinh thể RebD thu được bằng cách thực hiện quá trình tách rắn-lỏng. Bộ lọc để sử dụng trong quá trình tách rắn-lỏng là bộ lọc màng 0,45um sản xuất bởi Advantec Co., Ltd.

Sau đó, tinh thể RebD được rửa bằng etanol 99% khối lượng. Tinh thể RebD sau khi rửa được làm khô ở 50°C, và do đó thu được sản phẩm kết tinh RebD.

Tỷ lệ của glycosit giữa sản phẩm kết tinh RebD thu được và phân lọc được phân tích bằng LCMS (LCMS 8050 sản xuất bởi Shimadzu Corporation). Các kết quả được minh họa trên Fig.3 và Fig.4.

Trong trường hợp sử dụng etanol có nồng độ 95% khối lượng trong các điều kiện của thử nghiệm này, không thể thực hiện quá trình tách rắn-lỏng do sự gia tăng độ nhớt của huyền phù đặc. Mặc khác, trong trường hợp etanol có nồng độ khoảng 70% khối lượng, tinh thể không được kết tủa.

Trong lúc Fig.4 cho thấy rằng sự kết tủa tinh thể có xu hướng kém đi trong trường hợp nồng độ etanol thấp, Fig.3 cho thấy rằng độ tinh khiết của RebD không bị ảnh hưởng nhiều bởi nồng độ etanol. Nhận thấy rằng nồng độ dung môi etanol tối ưu có mặt ở tỷ lệ của TSG với dung môi, được chấp nhận trong thử nghiệm này (13,8%).

Ví dụ thử nghiệm 4

Tốc độ làm nguội có ảnh hưởng lớn đến sự xuất hiện của nhân tinh thể và sự phát triển tinh thể. Chẳng hạn, trong trường hợp của tốc độ làm nguội cao, sự tiêu thụ của quá trình siêu bão hòa được thực hiện không toàn toàn và sự tạo nhân thường chiếm ưu thế, trong quá trình phát triển tinh thể từ trạng thái ban đầu của một vài nhân. Mặc khác, trong trường hợp quá trình giảm nhiệt độ có tốc độ thấp, sự phát triển tinh thể chiếm ưu thế. Tuy nhiên, thời gian kết tinh có xu hướng dài hơn trong trường hợp này, trong lúc phụ thuộc vào mức tiêu thụ của quá trình siêu bão hòa.

Trong thử nghiệm này, ảnh hưởng của tốc độ làm nguội lên tỷ lệ thành phần và sản lượng TSG được nghiên cứu.

Cụ thể, sản phẩm kết tinh RebD thu được bằng cách thực hiện quá trình kết tinh sơ cấp theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 3 ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận thay cho các điều kiện trong bảng 3.

Bảng 4

Các thông số của quá trình kết tinh sơ cấp	
Mẫu	Sản phẩm được tinh chế thô 250g
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 1100ml
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	80°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C
Thời gian	6 giờ
Tốc độ khuấy trộn	600rpm
Profin nhiệt độ	Làm nguội nhanh, có kiểm soát (xem Fig.5)
Mầm tinh thể	-

Các kết quả được minh họa trên Fig.6 và Fig.7. Như rõ ràng từ Fig.6 và Fig.7, thu được sản phẩm kết tủa có độ tinh khiết của RebD so với TSG thấp hơn ở tốc độ giảm nhiệt độ cao hơn. Sản lượng cũng giảm. Sản phẩm kết tủa có các đặc tính nhớt thu được

ở tốc độ giảm nhiệt độ cao hơn. Mặc khác, không xác nhận được các đặc tính nhớt ở tốc độ giảm nhiệt độ thấp hơn.

Ví dụ thử nghiệm 5

Thời gian kết tinh có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển tinh thể và còn có ảnh hưởng đến chu kỳ thời gian của toàn bộ bước tinh chế. Do đó, thời gian kết tinh còn có ảnh hưởng đến chi phí và các đặc tính sản phẩm (sản lượng, độ tinh khiết, và tương tự). Do đó, ảnh hưởng của thời gian kết tinh lên tỷ lệ thành phần và sản lượng TSG được nghiên cứu trong thử nghiệm này.

Cụ thể, sản phẩm kết tinh RebD thu được bằng cách thực hiện quá trình kết tinh sơ cấp theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 3 ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận thay cho các điều kiện trong bảng 3.

Bảng 5

Các thông số của quá trình kết tinh sơ cấp	
Mẫu	Sản phẩm được tinh chế thô 250g
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 1100ml
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	80°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C
Thời gian	6 giờ, 12 giờ
Tốc độ khuấy trộn	600rpm
Profin nhiệt độ	có kiểm soát (xem Fig.8)
Mầm tinh thể	-

Các kết quả được minh họa trên Fig.9 và Fig.10. Nhận thấy rằng thời gian kết tinh, trong lúc không ảnh hưởng đến tỷ lệ thành phần của glycosit, có ảnh hưởng đến sản lượng. Tinh thể được kết tủa thêm nữa ra khỏi phần lọc sau quá trình kết tinh trong trường hợp kết tinh trong 6 giờ. Từ đó cho rằng thời gian kết tinh cần ít nhất lớn hơn

hoặc bằng 12 giờ. Ở đây cho rằng việc rút ngắn hơn nữa thời gian có thể phụ thuộc vào việc có hay không mầm tinh thể được sử dụng.

Ví dụ thử nghiệm 6

Trong thử nghiệm này, việc có hay không quá trình kết tinh thứ cấp được thực hiện với sản phẩm kết tinh sơ cấp được nghiên cứu cho mục đích gia tăng thêm nữa độ tinh khiết của RebD. Cụ thể, các điều kiện kết tinh sơ cấp được xác định như được thể hiện trong bảng dưới đây, dựa vào các kết quả của các ví dụ thử nghiệm 2 đến 5. Sản phẩm kết tinh sơ cấp của RebD sau đó thu được bằng cách thực hiện quá trình kết tinh sơ cấp theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 3 ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận thay cho các điều kiện trong bảng 3.

Bảng 6

Các thông số của quá trình kết tinh sơ cấp	
Mẫu	Sản phẩm được tinh chế thô 250g
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 1100ml
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	80°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C
Thời gian	Lớn hơn hoặc bằng 6 giờ
Tốc độ khuấy trộn	600rpm
Profin nhiệt độ (mức giảm)	có kiểm soát
Mầm tinh thể	-

Sau đó, sản phẩm kết tinh thứ cấp của RebD thu được bằng cách thực hiện quá trình kết tinh thứ cấp theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 3 ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận thay cho các điều kiện trong bảng 3. Ở đây, tỷ lệ của RebD với dung môi là 0,56% khối lượng. Độ siêu bão hòa của RebA (10°C) là -0,66 và độ siêu bão hòa của RebD (10°C) là 53,6.

Bảng 7

Các thông số của quá trình kết tinh thứ cấp	
Mẫu	Sản phẩm được tinh chế sơ cấp 15,4g
Dung môi	EtOH 90,0% khối lượng, 85% khối lượng, 75% khối lượng, 70% khối lượng, 1100ml
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	70°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C
Thời gian	12 giờ
Tốc độ khuấy trộn	350rpm
Profin nhiệt độ (mức giảm)	có kiểm soát
Mầm tinh thể	-

Các kết quả được minh họa trên Fig.11 và Fig.12. Nhận thấy rằng sản lượng bị giảm bởi sự giảm nồng độ ethanol cũng trong quá trình kết tinh thứ cấp như trong trường hợp nghiên cứu dung môi trong quá trình kết tinh sơ cấp trong ví dụ thử nghiệm 3.

Đối với thông tin về tỷ lệ thành phần cuối cùng và tỷ lệ sản lượng của tinh thể trong ví dụ thử nghiệm này, tỷ lệ sản lượng bằng khoảng 43% khối lượng trong trường hợp các hoạt động cho tới khi kết tinh thứ cấp được thực hiện trong các điều kiện tại đó đạt được độ tinh khiết khoảng 90% (nghĩa là, nồng độ ethanol trong quá trình kết tinh thứ cấp bằng 70% khối lượng).

Ví dụ thử nghiệm 7

Trong ví dụ thử nghiệm này, trường hợp được nghiên cứu không phải là RebD, mà RebA được kết tinh trong quá trình kết tinh sơ cấp.

Quá trình chiết được thực hiện với lá khô của cây cỏ ngọt, và phần chiết tạo ra được tách rắn-lỏng. Tỷ lệ hàm lượng của mỗi steviol glycosit trong lá khô (đơn vị: % khối lượng) là như sau. Hàm lượng của TSG trong lá khô được sử dụng trong ví dụ thử

nghiệm này bằng 16,6g trên mỗi 100g.

Bảng 8

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM	Chất khác
11,7	0,1	1,0	0,6	2,6	0,3	0,3	83,4

Chất lỏng đã được làm trong sau quá trình tách rắn-lỏng được trải qua các bước gồm keo tụ, tinh chế bằng nhựa, và cô đặc bằng cách làm bay hơi. Kết quả là, thu được sản phẩm tinh chế thô có tỷ lệ thành phần (đơn vị: % khối lượng) được thể hiện trong bảng dưới đây. Tỷ lệ của RebD trên TSG trong sản phẩm tinh chế thô là 3,8% khối lượng.

Bảng 9

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM
69,5	0,4	5,3	3,8	18,3	1,8	1,5

Lượng sau đây của sản phẩm tinh chế thô được hòa tan với nồng độ và lượng dung môi etanol (40°C) sau đây. Tỷ lệ bổ sung RebD vào dung môi là 0,22% khối lượng.

Tiếp theo, tinh thể RebA được lắng đọng bằng cách làm nguội trong các điều kiện profin nhiệt độ và khuấy trộn sau đây. Bình đáy tròn có thể tách rời (sản xuất bởi Tokyo Rikakikai Co., Ltd.) được sử dụng để lắng đọng. Rượu không cải biến (loại 99,9% khối lượng) được sử dụng làm etanol.

Tiếp theo, tinh thể RebA thu được bằng cách thực hiện quá trình tách rắn-lỏng. Bộ lọc để sử dụng trong quá trình tách rắn-lỏng là bộ lọc màng 0,45um sản xuất bởi Advantec Co., Ltd.

Sau đó, tinh thể RebA được rửa bằng etanol 99% khối lượng. Tinh thể RebA sau khi rửa được làm khô ở 50°C.

Bảng 10

Các thông số của quá trình kết tinh sơ cấp	
Mẫu	Sản phẩm được tinh chế thô 25,8g
Dung môi	EtOH 99% khối lượng, 70ml
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	40°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	4°C
Thời gian	18 giờ
Tốc độ khuấy trộn	350rpm
Profin nhiệt độ	có kiểm soát
Mầm tinh thể	-

Sản phẩm kết tinh sơ cấp được phân tích bằng LCMS 8050 sản xuất bởi Shimadzu Corporation. Bảng 11 dưới đây thể hiện tỷ lệ của mỗi steviol glycosit với TSG trong sản phẩm kết tinh sơ cấp (đơn vị: % khối lượng). Bảng 12 mô tả thông tin về tỷ lệ sản lượng (đơn vị: % khối lượng). Độ tinh khiết của RebA so với TSG là 98,6% và tỷ lệ sản lượng của RebA là 41,8%. Kết quả là, khoảng 11,5% khối lượng của hiệu suất của RebD được hợp nhất vào tinh thể RebA.

Bảng 11

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM
98,6	0	0	1,4	0	0	0

Bảng 12

	RebA	RebD
Sản phẩm kết tinh sơ cấp (kết tinh RebA)	41,80	11,51

Tiếp theo, quá trình kết tinh RebD từ nước cái của quá trình kết tinh sơ cấp được

thử bằng mẫu tinh thể RebD. Độ tinh khiết của RebD so với TSG là lớn hơn hoặc bằng 94% khối lượng, như được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 13

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM
4,1	0,2	0,3	94,1	1,4	0,0	0,0

Ví dụ thử nghiệm 8

Trong thử nghiệm này, các điều kiện được tối ưu hóa thu được dưới dạng các kết quả của thử nghiệm quy mô nhỏ được thực hiện trong phòng thí nghiệm được chấp nhận để thực hiện quá trình kết tinh RebD.

Quá trình chiết được thực hiện với lá khô của cây cỏ ngọt, và phần chiết tạo ra được tách rắn-lỏng. Tỷ lệ hàm lượng của mỗi steviol glycosit trong lá khô là như sau. Hàm lượng của TSG trong lá khô được sử dụng trong ví dụ thử nghiệm này là 8,7g trên mỗi 100g.

Bảng 14

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM	Chất khác
6,2	0,1	0,4	0,7	0,6	0,2	0,5	91,3

Chất lỏng đã được làm trong sau quá trình tách rắn-lỏng được trải qua các bước gồm keo tụ, tinh chế bằng nhựa, và cô đặc bằng cách làm bay hơi. Kết quả là, thu được sản phẩm tinh chế thô có tỷ lệ thành phần (đơn vị: % khối lượng) được thể hiện trong bảng dưới đây. Tỷ lệ của RebD trên TSG trong sản phẩm tinh chế thô là 4,6% khối lượng. Tỷ lệ của TSG trong sản phẩm tinh chế thô là 54,0% khối lượng.

Bảng 15

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM	Chất khác
39,0	0	2,3	2,5	8,2	1,2	0,78	46,0

Lượng sau đây của sản phẩm tinh chế thô (được thể hiện dưới dạng mẫu trong bảng) được hòa tan theo nồng độ sau đây và lượng dung môi etanol (40°C). Ở đây, tỷ lệ của TSG với dung môi là 12,5% khối lượng, tỷ lệ của RebD với dung môi là 0,58% khối lượng, độ siêu bão hòa của RebA (10°C) là 9,98, và độ siêu bão hòa của RebD (10°C) là 57,64.

Tiếp theo, quá trình kết tinh được thực hiện bằng cách làm nguội trong các điều kiện profin nhiệt độ và khuấy trộn sau đây. Bình đáy tròn có thể tách rời (sản xuất bởi Tokyo Rikakikai Co., Ltd.) được sử dụng trong quá trình kết tinh. Rượu không cải biến (loại 99,9% khối lượng) được sử dụng làm etanol, và nước được bổ sung thích hợp vào đó để điều chỉnh nồng độ etanol.

Tiếp theo, tinh thể thu được bằng cách thực hiện quá trình tách rắn-lỏng. Bộ lọc để sử dụng trong quá trình tách rắn-lỏng là bộ lọc màng 0,45um sản xuất bởi Advantec Co., Ltd.

Sau đó, tinh thể được rửa bằng etanol 99% khối lượng. Tinh thể sau khi rửa được làm khô ở 50°C.

Bảng 16

Các thông số của quá trình kết tinh sơ cấp	
Mẫu	18,6g
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 80ml
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	40°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	17°C
Thời gian	18 giờ
Tốc độ khuấy trộn	350rpm
Profin nhiệt độ	có kiểm soát
Mầm tinh thể	-

Nhờ quá trình kết tinh sơ cấp, có thể thu được 343mg tinh thể có độ tinh khiết của TSG (tỷ lệ của TSG trên sản phẩm kết tinh) bằng 76,2% và độ tinh khiết của RebD (tỷ lệ của RebD trên TSG) bằng 70,5%. Tỷ lệ sản lượng (tỷ lệ sản lượng trên mỗi bước đơn vị) là 39,5%.

Ví dụ thử nghiệm 9

Quá trình chiết được thực hiện với lá khô của cây cỏ ngọt, và phần chiết tạo ra được tách rắn-lỏng. Tỷ lệ của mỗi steviol glycosit trên TSG trong lá khô (% khối lượng) là như được mô tả dưới đây. Hàm lượng của TSG trong lá khô được sử dụng trong ví dụ thử nghiệm này là 11,8g trên mỗi 100g.

Bảng 17

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM
76,1	0,9	4,4	6,9	3,6	2,4	5,8

Chất lỏng đã được làm trong sau quá trình tách rắn-lỏng được trải qua các bước gồm keo tụ, tinh chế bằng nhựa, và cô đặc bằng cách làm bay hơi. Chế phẩm steviol glycosit tạo ra được sấy phun, để thu được sản phẩm tinh chế thô. Tỷ lệ thành phần của sản phẩm tinh chế thô sau khi sấy phun là như sau.

Bảng 18

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM	Chất khác
41,0	0,3	2,9	3,7	3,7	1,4	2,9	44,0

Rượu không cải biến (loại 99,9% khối lượng) được sử dụng, và nước được bổ sung thích hợp vào đó để điều chỉnh etanol có nồng độ và lượng sau đây.

Dụng cụ chứa dùng cho quá trình kết tinh (có dung tích 1l) được trang bị máy khuấy được nạp dung môi etanol và được gia nhiệt.

Khi nhiệt độ của dung môi etanol đạt khoảng 55°C, dụng cụ chứa được nạp sản phẩm tinh chế thô.

Nhiệt độ được giảm bằng cách khuấy trộn ở khoảng 350rpm. Việc làm nguội ở đây được thực hiện đồng đều đối với thời gian làm nguội (nghĩa là, 11 giờ) - 1 giờ (nghĩa là, 10 giờ).

Sau khi hoàn thành quá trình kết tinh, quá trình tách rắn-lỏng được thực hiện. Bộ lọc để sử dụng trong quá trình tách rắn-lỏng là bộ lọc màng 0,45um sản xuất bởi Advantec Co., Ltd.

Tinh thể tạo ra được làm khô ở 60 đến 70°C.

Bảng 19

Các thông số của quá trình kết tinh sơ cấp	
Tỷ lệ của TSG với dung môi	12,8% khối lượng
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 482ml
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	55°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	17°C
Thời gian	11 giờ
Tốc độ khuấy trộn	350rpm
Mức giảm nhiệt độ	có kiểm soát
Mầm tinh thể	-

Tỷ lệ sản lượng trên mỗi bước đơn vị (tỷ lệ RebD kết tinh với RebD bao gồm trong sản phẩm tinh chế thô trước quá trình kết tinh) là 80,0% khối lượng. Độ tinh khiết của TSG (tỷ lệ của TSG với sản phẩm kết tinh) là 63,2% khối lượng và độ tinh khiết của RebD (tỷ lệ của RebD với TSG) là 35,8% khối lượng.

Ví dụ thử nghiệm 10

Thử nghiệm này nghiên cứu về quá trình kết tinh RebD trong trường hợp một

lượng lớn RebA có mặt trong dung môi etanol, nghĩa là, trong trường hợp của độ siêu bão hòa cao của RebA.

1. Chiết-tách rắn-lỏng

Nước trao đổi ion với lượng 15 lần (khối lượng) so với lá cỏ ngọt khô (tỷ lệ hàm lượng nước: 3 đến 4% trọng lượng) được gia nhiệt đến $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, và lá cỏ ngọt khô được ngâm trong nước. Sau đó, quá trình chiết được thực hiện bằng thiết bị chiết nhào trộn (SKN-R100, sản xuất bởi Sanyukiki Co., Ltd.) trong 60 phút, bằng cách khuấy trộn bằng thanh khuấy ở tốc độ 8rpm. Tiếp theo, quá trình lọc được thực hiện bằng cách cho đi qua rây 18-mech và 140-mech, quá trình làm nguội được thực hiện bằng nước lạnh trong thiết bị trao đổi nhiệt, và phần lọc được tách rắn-lỏng trong máy ly tâm dạng đĩa (9150rpm (11601G), 24l/phút), để thu được chất lỏng chiết sơ cấp. Trong khi đó, lá sau khi lọc được chiết lần nữa trong cùng các điều kiện và được tách rắn-lỏng để thu được phần chiết lỏng thứ cấp trong suốt, và chất lỏng chiết này được bổ sung vào chất lỏng chiết sơ cấp để thu được chất lỏng đã được làm trong.

Tỷ lệ của mỗi steviol glycosit trên TSG trong lá khô được đo theo phương pháp sắc ký lỏng-phổ khối (liquid chromatography mass spectrometry, LC/MS/MS) (LCMS 8050 sản xuất bởi Shimadzu Corporation). Các kết quả được thể hiện trong bảng dưới đây (đơn vị: % khối lượng).

Bảng 20

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM
68,3	0,6	4,2	10,2	10,2	1,8	4,8

2. Keo tụ

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ (được tính từ Brix (nồng độ hàm lượng chất rắn tan được)) được bổ sung vào chất lỏng đã được làm trong với lượng tương ứng với 16,16% khối lượng của

hàm lượng chất rắn tan được trong chất lỏng đã được làm trong, và chất lỏng hỗn hợp tạo ra được khuấy trộn trong 15 phút. Sau đó, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ được bổ sung với lượng tương ứng đến 28,28% khối lượng của hàm lượng chất rắn tan được trong chất lỏng đã được làm trong, chất lỏng hỗn hợp được khuấy trộn trong 30 phút và độ pH được điều chỉnh đến 7 bằng axit xitric, và sau đó dung dịch chitosan 0,5% (trọng lượng/thể tích) được bổ sung theo thể tích (ml) tương ứng với 5,63 lần hàm lượng chất rắn tan được (g) trong chất lỏng đã được làm trong. Chất lỏng hỗn hợp được khuấy trộn mạnh trong 3 phút và khuấy trộn nhẹ trong 2 phút, và sau đó để yên trong 10 phút. Sau đó, sản phẩm kết tủa hóa rắn mang điện trung tính được loại bỏ bằng cách ly tâm. Kết quả là, thu được chất lỏng xử lý trong suốt.

3. Tinh chế bằng nhựa

Trong quá trình tinh chế bằng nhựa, được thực hiện là (i) tinh chế bằng nhựa trao đổi anion và (ii) tinh chế bằng nhựa xốp kỵ nước (nhóm trao đổi ion không được đưa vào).

(i) Tinh chế bằng nhựa trao đổi anion

Cột được nhồi nhựa trao đổi anion bazơ có độ xốp cao (sản xuất bởi Mitsubishi Chemical Corporation), và cột này được nạp chất lỏng xử lý sau khi keo tụ và tách, để thực hiện quá trình tinh chế. Cột được nạp chất lỏng xử lý sau khi keo tụ và tách, và sau đó được đẩy bằng nước trao đổi ion theo thể tích bằng hai lần thể tích của cột, và dung dịch bao gồm chế phẩm steviol glycosit tinh chế được thu hồi. Các tạp chất màu đen và thành phần có màu trong chất lỏng xử lý được loại bỏ bằng quá trình tinh chế này.

(ii) Tinh chế bằng nhựa xốp kỵ nước

Cột được nhồi nhựa xốp kỵ nước (sản xuất bởi Mitsubishi Chemical Corporation), và cột này được nạp mẫu thử nghiệm sau bước (i) tinh chế bằng nhựa trao đổi anion, để thực hiện quá trình tinh chế. Nhựa xốp kỵ nước được sử dụng ở đây là nhựa mà là copolyme của styren và divinylbenzen, không có nhóm trao đổi ion, và có bán

kính lỗ xấp thường gặp nhất bằng 45Å. Cột được nạp dung dịch sau bước (i) tinh chế đã mô tả ở trên, và sau đó cột được rửa bằng dung dịch axit xitric 0,01M trong nước với thể tích bằng 3 lần thể tích của cột và dung dịch natri hydroxit 0,01M trong nước với thể tích bằng 3 lần thể tích của cột. Sau đó, chế phẩm steviol glycosit được rửa giải và thu hồi bằng dung dịch ethanol 60% trong nước với thể tích bằng 4 lần thể tích của cột.

4. Cô đặc bằng cách làm bay hơi

Thiết bị làm bay hơi chân không màng mỏng ly tâm Evapol (sản xuất bởi Okawara Mfg. Co., Ltd.) được sử dụng để loại bỏ ethanol bằng cách cô đặc bằng cách làm bay hơi dung dịch. Nước còn lại ngay cả sau khi xử lý cô đặc bằng cách làm bay hơi, và chế phẩm ở dạng chất lỏng.

Chế phẩm steviol glycosit tạo ra được sấy phun, để thu được sản phẩm tinh chế thô. Tỷ lệ thành phần của sản phẩm tinh chế thô sau khi sấy phun (đơn vị: % khối lượng) là như sau.

Bảng 21

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM	Các chất khác
67,0	0,0	4,1	7,5	11,5	1,6	3,3	5,1

Quá trình kết tinh được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 9 ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận. Các kết quả được thể hiện trong bảng 31 dưới đây.

Bảng 22

Các thông số của quá trình kết tinh sơ cấp	
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 734,8ml
Tỷ lệ của RebD với dung môi	1,6% khối lượng
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	55°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C

Thời gian	11 giờ
Tốc độ khuấy trộn	350rpm
Profin nhiệt độ	có kiểm soát
Mảm tinh thể (RebD)	Cs=0,08

Ví dụ thử nghiệm 11

Quá trình chiết và quá trình tách rắn-lỏng được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10. Tỷ lệ của mỗi steviol glycosit trên TSG trong lá khô (% khối lượng) được đo theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10, và như được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 23

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM
68,4	1,0	5,4	9,2	7,8	1,5	6,6

Các bước gồm keo tụ, tinh chế bằng nhựa, và cô đặc bằng cách làm bay hơi được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10. Chế phẩm steviol glycosit tạo ra được sấy phun, để thu được sản phẩm tinh chế thô. Tỷ lệ thành phần của sản phẩm tinh chế thô sau khi sấy phun (% khối lượng) là như sau.

Bảng 24

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM	Các chất khác
64,8	0,6	5,5	8,1	9,1	1,3	4,7	6,0

Quá trình kết tinh sơ cấp được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 9 ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận.

Bảng 25

Các thông số của quá trình kết tinh sơ cấp	
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 1117ml
Tỷ lệ của RebD với dung môi	1,6% khối lượng
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	55°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C
Thời gian	7,5 giờ
Tốc độ khuấy trộn	350rpm
Profin nhiệt độ	có kiểm soát
Mầm tinh thể (RebD)	Cs=0,08

Quá trình kết tinh thứ cấp được thực hiện theo cùng một cách như trong quá trình kết tinh sơ cấp ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận. Các kết quả được thể hiện trong các bảng 31 đến 33 dưới đây.

Bảng 26

Các thông số của quá trình kết tinh thứ cấp	
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 715ml
Tỷ lệ của RebD với dung môi	2,2% khối lượng
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	55°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C
Thời gian	24 giờ
Tốc độ khuấy trộn	350rpm
Profin nhiệt độ	có kiểm soát
Mầm tinh thể (RebD)	Cs=0,08

Ví dụ thử nghiệm 12

Quá trình chiết và quá trình tách rắn-lỏng được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10. Tỷ lệ của mỗi steviol glycosit trên TSG trong lá khô (% khối lượng) được đo theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10, và như được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 27

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM
53,6	1,2	4,2	20,5	11,2	1,1	8,2

Các bước gồm keo tụ, tinh chế bằng nhựa, và cô đặc bằng cách làm bay hơi được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10. Chế phẩm steviol glycosit tạo ra được sấy phun, để thu được sản phẩm tinh chế thô. Tỷ lệ thành phần của sản phẩm tinh chế thô sau khi sấy phun (% khối lượng) là như sau

Bảng 28

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM	Các chất khác
50,8	0,4	4,7	15,3	13,8	1,1	5,9	8,1

Quá trình kết tinh được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 9 ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận. Độ siêu bão hòa của RebA (10°C) là 8,2 và độ siêu bão hòa của RebD (10°C) là 160,1.

Bảng 29

Các thông số của quá trình kết tinh sơ cấp	
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 1538ml
Tỷ lệ của RebD với dung môi	1,6% khối lượng
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	55°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C

Thời gian	7,5 giờ
Tốc độ khuấy trộn	200rpm
Profin nhiệt độ	có kiểm soát
Mầm tinh thể (RebD)	Cs=0,08

Quá trình kết tinh thứ cấp được thực hiện theo cùng một cách như trong quá trình kết tinh sơ cấp ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận. Các kết quả được thể hiện trong bảng 32 và bảng 33.

Bảng 30

Các thông số của quá trình kết tinh thứ cấp	
Lượng sản phẩm tinh chế thô được bổ sung	Khoảng 42g
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 715ml
Tỷ lệ của RebD với dung môi	3,4% khối lượng
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	55°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C
Thời gian	24 giờ
Tốc độ khuấy trộn	200rpm
Profin nhiệt độ	có kiểm soát
Mầm tinh thể	-

Các bảng dưới đây thể hiện độ tinh khiết và độ siêu bão hòa của mỗi thành phần, và tỷ lệ sản lượng của RebA trên mỗi bước đơn vị-tỷ lệ sản lượng của RebD trên mỗi bước đơn vị, trong các sản phẩm tinh chế thô được sử dụng trong các ví dụ thử nghiệm 10 đến 12.

Mỗi độ tinh khiết của RebA và độ tinh khiết của RebD được đo bằng LCMS

8050 sản xuất bởi Shimadzu Corporation, và được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ (trọng lượng/trọng lượng) so với TSG.

Công thức tính độ siêu bão hòa là như đã mô tả ở trên. Khi tính độ siêu bão hòa, các độ tan bão hòa tương ứng (EtOH 90% khối lượng, 10°C) của RebA và RebD là như sau.

$$\text{RebA} = 8270,5\text{ppm}$$

$$\text{RebD} = 99,33\text{ppm}$$

Tỷ lệ sản lượng của RebA trên mỗi bước đơn vị là tỷ lệ của lượng của RebA được bao gồm trong sản phẩm kết tinh với lượng của RebA trong nguyên liệu thô được sử dụng trong quá trình kết tinh. Điều tương tự được áp dụng với tỷ lệ sản lượng của RebD trên mỗi bước đơn vị.

Bảng 31

Ví dụ thử nghiệm	Độ tinh khiết của RebA trước khi kết tinh sơ cấp (% khối lượng)	Độ tinh khiết của RebD trước khi kết tinh sơ cấp (% khối lượng)	Độ tinh khiết của TSG trước khi kết tinh sơ cấp (% khối lượng)	Độ quá bão hòa σ (RebA) trước khi kết tinh sơ cấp	Độ quá bão hòa σ (RebD) trước khi kết tinh sơ cấp	$\sigma(D)/\sigma(A)$	Độ tinh khiết của RebA sau khi kết tinh sơ cấp (% khối lượng)	Độ tinh khiết của RebD sau khi kết tinh sơ cấp (% khối lượng)	Tỷ lệ sản lượng của RebA trên mỗi bước đơn vị trong quá trình kết tinh sơ cấp (%)	Tỷ lệ sản lượng của RebD trên mỗi bước đơn vị trong quá trình kết tinh sơ cấp (%)
10	67,1	7,5	94,89	18,54	179,9	9,70	78,3	13,5	52,6	84,2
11	64,8	8,1	94	14,7	161,2	11,0	26,0	63,4	4,1	82,5

Bảng 32

Ví dụ thử nghiệm	Độ tinh khiết của RebA trước khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ tinh khiết của RebD trước khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ tinh khiết của TSG trước khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ quá bão hòa σ (RebA) ở 10°C	Độ quá bão hòa σ (RebD) ở 10°C	$\sigma(D)/\sigma(A)$	Độ tinh khiết của RebA sau khi kết tinh thứ cấp (% khối lượng)	Độ tinh khiết của RebD sau khi kết tinh thứ cấp (% khối lượng)	Tỷ lệ sản lượng của RebA trên mỗi bước đơn vị (%)	Tỷ lệ sản lượng của RebD trên mỗi bước đơn vị (%)
11	26,0	63,4	109,5	0,00027	202,348	749437,0	4,0	92,2	97,7	
12	49,4	14,8	112,8	6,2	179,6	29,0	11,5	84,9	85,7	

Bảng 33

	Ví dụ thử nghiệm	Dung môi	Lượng dung môi (ml)	Mầm tinh thể (mg)	Nhiệt độ (ban đầu)	Nhiệt độ (kết thúc)	Thời gian (giờ)	Độ tinh khiết của RebD (%)
Kết tinh lần thứ nhất	11	EtOH 90%	1117,1	1240	55	10	7,5	63,4
	12	EtOH 90%	1538,6	1957	55	10	7,5	55,1
Kết tinh lần thứ hai	11	EtOH 90%	715	1149	55	10	24	92,2
	12	EtOH 90%	715	-	55	10	24	85,0

Giả định rằng sự kết tủa của RebA, trong lúc phụ thuộc vào độ siêu bão hòa của RebD, được tăng lên với độ siêu bão hòa của RebA nằm trong khoảng từ 15 đến 18 làm ranh giới. Trong lúc một số độ tinh khiết lớn hơn 100% trong các bảng nêu trên, lý do cho điều này được cho là vì trọng lượng được tăng lên do dung môi còn lại hoặc có bất kỳ sai số phân tích nào.

Ví dụ thử nghiệm 13

Thử nghiệm này nghiên cứu về việc có hay không tỷ lệ thành phần của sản phẩm kết tinh RebD bị thay đổi khi sử dụng dung môi etanol làm dung môi để kết tinh, so với khi sử dụng dung môi metanol.

Hai loại sản phẩm kết tinh RebD thu được. Cả hai sản phẩm này được cho là được kết tinh bằng dung môi metanol. Mẫu số 1 là sản phẩm kết tinh RebD sản xuất bởi GLG, và mẫu số 2 là sản phẩm kết tinh RebD sản xuất bởi JNRJ.

Sản phẩm kết tinh thứ cấp của RebD thu được trong ví dụ thử nghiệm 11 được chấp nhận là mẫu số 3.

Quá trình chiết và quá trình tách rắn-lỏng được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10. Tỷ lệ của mỗi steviol glycosit trên TSG trong lá khô (% khối lượng) được đo theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10, và như được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 34

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM
66,9	1,1	5,1	9,6	12,5	1,3	3,4

Các bước gồm keo tụ, tinh chế bằng nhựa, và cô đặc bằng cách làm bay hơi được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10. Chế phẩm steviol glycosit tạo ra được sấy phun, để thu được sản phẩm tinh chế thô. Tỷ lệ thành phần của sản phẩm tinh chế thô sau khi sấy phun (% khối lượng) là như sau.

Bảng 35

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM	Chất khác
55,8	0,1	0,0	6,6	11,1	1,1	2,4	22,9

Quá trình kết tinh sơ cấp được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 9 ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận. Độ siêu bão hòa của RebA (10°C) là 16,1 và độ siêu bão hòa của RebD (10°C) là 160,2.

Bảng 36

Các thông số của quá trình kết tinh sơ cấp	
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 819ml
Tỷ lệ của RebD với dung môi	1,6% khối lượng
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	55°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C
Thời gian	6 giờ
Tốc độ khuấy trộn	200rpm
Profin nhiệt độ	có kiểm soát
Mảm tinh thể (RebD)	Cs=0,08

Quá trình kết tinh thứ cấp được thực hiện theo cùng một cách như trong quá trình kết tinh sơ cấp ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận.

Bảng 37

Các thông số của quá trình kết tinh thứ cấp	
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 715ml
Tỷ lệ của RebD với dung môi	1,94% khối lượng
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	55°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C

Thời gian	24 giờ
Tốc độ khuấy trộn	200rpm
Profin nhiệt độ	có kiểm soát
Mầm tinh thể (RebD)	-

Sản phẩm kết tinh thứ cấp của RebD thu được được chấp nhận là mẫu số 4.

Bảng 38

Độ tinh khiết của RebA trước khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ tinh khiết của RebD trước khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ tinh khiết của TSG trước khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ quá bão hòa σ (RebA) ở 10°C	Độ quá bão hòa σ (RebD) ở 10°C	$\sigma(D)/\sigma(A)$	Độ tinh khiết của RebA sau khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ tinh khiết của RebD sau khi kết tinh thứ cấp (%)	Tỷ lệ sản lượng của RebD trên mỗi bước đơn vị (%)
25,9	57,8	115	0,04943	193,81	3920,8	8,3	90,6	86,7

Sản phẩm kết tinh thứ cấp của RebD thu được trong ví dụ thử nghiệm 12 được chấp nhận là mẫu số 5.

Sản phẩm thu được bằng cách làm khô thêm nữa mẫu số 4 ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 70°C trong 3 ngày được chấp nhận là mẫu số 6.

Sản phẩm thu được bằng cách làm khô thêm nữa mẫu số 5 ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 70°C trong 3 ngày được chấp nhận là mẫu số 7.

Mỗi trong số các mẫu được hòa tan trong dimethylformamit lần lượt, và hàm lượng metanol và hàm lượng etanol được đo bằng HS (head space)-GC/MS. Các kết quả được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 39

Số	Làm khô thêm	MeOH (ppm)	EtOH (ppm)	MeOH/EtOH	Giá trị tối thiểu của MeOH/EtOH kỳ vọng*
1	Không	5	4000	0,00125	0,00100
2		30	1500	0,02000	0,00600
3		0,9 Nhỏ hơn giới hạn xác định tối thiểu	4200	0,00021	
4		9	13000	0,00069	
5		1,8 Nhỏ hơn giới hạn xác định tối thiểu	11000	0,00016	
6	Có	4	9500	0,00042	
7		3	6500	0,00046	

*được tính bằng cách cho rằng giới hạn dưới của EtOH thông thường theo lượng chuẩn là 5000ppm

Ví dụ thử nghiệm 14

1. Chiết- tách rắn-lỏng

Nước với lượng 15 lần (khối lượng) so với lá cỏ ngọt khô (tỷ lệ hàm lượng nước: 9 đến 11% trọng lượng) được gia nhiệt đến 60 đến 65°C, và lá cỏ ngọt khô được ngâm trong nước. Sau đó, quá trình chiết được thực hiện trong 60 phút, bằng cách khuấy trộn ở tốc độ 75rpm bằng cách sử dụng cánh khuấy (bán kính 27cm × 2 cánh khuấy × 2 tầng) trong bể khuấy trộn (thể tích: 400l). Tiếp theo, hỗn hợp của lá cỏ ngọt khô và nước được lọc bằng cách cho đi qua rây (100-mesh) được làm bằng ni lông đặt trong phễu Buchner có đường kính bằng 95cm, đất chứa tảo silic (Celite 503) được bổ sung, quá trình lọc được thực hiện bằng cách lọc ép, và quá trình lọc bằng màng vi lọc (kích thước lỗ: 10µm) được thực hiện để tách rắn-lỏng, để thu được chất lỏng chiết sơ cấp. Trong khi đó, lá sau khi lọc được chiết lần nữa trong cùng các điều kiện và được tách rắn-lỏng để thu được phần chiết lỏng thứ cấp trong suốt, và chất lỏng chiết được bổ sung vào chất lỏng chiết sơ cấp để thu được chất lỏng đã được làm trong.

2. Keo tụ

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ (được tính từ Brix (nồng độ hàm lượng chất rắn tan được)) được bổ sung vào chất lỏng đã được làm trong với lượng tương ứng với 16,16% khối lượng của hàm lượng chất rắn tan được trong chất lỏng đã được làm trong, và chất lỏng hỗn hợp tạo ra được khuấy trộn trong 15 phút. Sau đó, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ được bổ sung với lượng tương ứng với 28,28% khối lượng của hàm lượng chất rắn tan được trong chất lỏng đã được làm trong, chất lỏng hỗn hợp được khuấy trộn trong 30 phút và độ pH được điều chỉnh đến 7 bằng axit xitric, và sau đó dung dịch chitosan 0,5% (trọng lượng/thể tích) được bổ sung theo thể tích (ml) tương ứng với 5,63 lần hàm lượng chất rắn tan được (g) trong chất lỏng đã được làm trong. Chất lỏng hỗn hợp được khuấy trộn mạnh trong 3 phút và khuấy trộn nhẹ trong 2 phút, và sau đó để yên trong 10 phút. Sau đó, sản phẩm kết tủa hóa rắn mang điện trung tính được loại bỏ bằng cách ly tâm. Kết quả là, thu được chất lỏng xử lý trong suốt.

3. Tinh chế bằng nhựa

Trong quá trình tinh chế bằng nhựa, được thực hiện là (i) tinh chế bằng nhựa trao đổi anion và (ii) tinh chế bằng nhựa xốp kỵ nước (nhóm trao đổi ion không được đưa vào).

(i) Tinh chế bằng nhựa trao đổi anion

Cột được nhồi nhựa trao đổi anion bazơ có độ xốp cao (sản xuất bởi Mitsubishi Chemical Corporation), và cột này được nạp chất lỏng xử lý sau khi keo tụ và tách, để thực hiện quá trình tinh chế. Cột được nạp chất lỏng xử lý sau khi keo tụ và tách, và sau đó được đẩy bằng nước trao đổi ion theo thể tích bằng hai lần thể tích của cột, và dung dịch bao gồm chế phẩm steviol glycosit tinh chế được thu hồi. Các tạp chất màu đen và thành phần có màu trong chất lỏng xử lý được loại bỏ bằng quá trình tinh chế này.

(ii) Tinh chế bằng nhựa xốp kỵ nước

Cột được nhồi nhựa xốp kỵ nước (sản xuất bởi Mitsubishi Chemical

Corporation), và cột này được nạp mẫu thử nghiệm sau bước (i) tinh chế bằng nhựa trao đổi anion, để thực hiện quá trình tinh chế. Nhựa xốp kỵ nước được sử dụng ở đây là nhựa mà là copolyme của styren và divinylbenzen, không có nhóm trao đổi ion, và có bán kính lỗ xốp thường gặp nhất bằng 45Å. Cột được nạp dung dịch sau bước (i) tinh chế đã mô tả ở trên, và sau đó cột được rửa bằng dung dịch axit xitric 0,01M trong nước với thể tích bằng 3 lần thể tích của cột và dung dịch natri hydroxit 0,01M trong nước với thể tích bằng 3 lần thể tích của cột. Sau đó, chế phẩm steviol glycosit được rửa giải và thu hồi bằng dung dịch etanol 60% trong nước với thể tích bằng 6 lần thể tích của cột.

4. Cô đặc bằng cách làm bay hơi

Thiết bị làm bay hơi chân không màng mỏng ly tâm Evapol (sản xuất bởi Okawara Mfg. Co., Ltd.) được sử dụng để loại bỏ etanol bằng cách cô đặc bằng cách làm bay hơi dung dịch. Tiếp theo, một thiết bị làm bay hơi được sử dụng để cô riêng rẽ ở hai giai đoạn, bằng cách đó loại bỏ etanol. Nước còn lại ngay cả sau khi xử lý cô đặc bằng cách làm bay hơi, và chế phẩm ở dạng chất lỏng.

Chế phẩm steviol glycosit tạo ra được sấy phun, để thu được sản phẩm tinh chế thô. Tỷ lệ thành phần của sản phẩm tinh chế thô sau khi sấy phun (đơn vị: % khối lượng) là như sau.

Bảng 40

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM	Chất khác
23,02%	0,55%	2,75%	25,45%	15,29%	0,68%	13,52%	18,73%

Rượu không cải biến (loại 99,9% khối lượng) được sử dụng, và nước được bổ sung thích hợp vào đó để điều chỉnh etanol có nồng độ và lượng sau đây.

Một bình riêng rẽ được nạp dung môi etanol, và được gia nhiệt.

Khi nhiệt độ của dung môi etanol đạt khoảng 71°C, dụng cụ chứa được nạp sản phẩm tinh chế thô và mầm tinh thể. Ở đây, độ siêu bão hòa của RebD (10°C) là 162,854

và độ siêu bão hòa của RebA (10°C) là 0,793.

Nhiệt độ được giảm bằng cách khuấy trộn.

Sau khi hoàn thành quá trình kết tinh, quá trình tách rắn-lỏng được thực hiện. Bộ lọc để sử dụng trong quá trình tách rắn-lỏng là bộ lọc màng 0,45µm sản xuất bởi Advantec Co., Ltd.

Tinh thể tạo ra được làm khô ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 60 đến 70°C.

Ở đây, tỷ lệ bổ sung mầm tinh thể (Cs) là 0,08.

Bảng 41

Các thông số của quá trình kết tinh sơ cấp	
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 35,2l
Tỷ lệ của RebD với dung môi	1,6% khối lượng
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	71°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	9°C
Thời gian	7 giờ
Profin nhiệt độ	không kiểm soát
Mầm tinh thể (RebD)	45,8g

Tỷ lệ của mỗi steviol glycosit trên TSG (ở đây bao gồm RebA, RebB, RebC, RebD, steviosit, RebF, RebM, RebN, dulcosit A, Rebl, RebG, rubusosit, steviobiosit, và RebE) trong sản phẩm kết tinh sơ cấp (% khối lượng) là như được thể hiện trong bảng dưới đây. Tỷ lệ sản lượng của RebD trên mỗi bước đơn vị cho tới khi kết tinh sơ cấp là 86,39% khối lượng. Tỷ lệ của TSG trong sản phẩm kết tinh sơ cấp là 97,4% khối lượng.

Bảng 42

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM
9,69%	1,14%	0,54%	78,08%	3,12%	0,14%	4,30%

RebN	DulcositA	Reb I	Reb G	Rubsosit	Steviobiosit	Reb E
1,60%	0,00%	0,05%	0,01%	0,01%	0,08%	1,22%

Quá trình kết tinh thứ cấp được thực hiện theo cùng một cách như trong quá trình kết tinh sơ cấp ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận. Chi tiết của profin nhiệt độ được minh họa trên Fig.13. Ở đây, độ siêu bão hòa của RebD (10°C) là 342,254 và độ siêu bão hòa của RebA (10°C) là -0,47.

Bảng 43

Các thông số kết tinh thứ cấp	
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 19,11
Lượng sản phẩm kết tinh sơ cấp được bổ sung	860g
Tỷ lệ của RebD với dung môi	3,41% khối lượng/thể tích
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	70°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C
Thời gian	24 giờ
Profin nhiệt độ	không kiểm soát
Mầm tinh thể (RebD)	52,3g

Tỷ lệ của mỗi steviol glycosit trên TSG trong sản phẩm kết tinh thứ cấp là như được thể hiện trong bảng dưới đây. Tỷ lệ sản lượng của RebD trên mỗi bước đơn vị cho tới khi kết tinh thứ cấp là 98,9% khối lượng. Tỷ lệ của TSG trong sản phẩm kết tinh thứ

cấp là 95,9% khối lượng.

Bảng 44

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM
3,89%	1,11%	0,02%	93,72%	0,30%	0,03%	0,93%

Ví dụ thử nghiệm 15

Quá trình chiết và quá trình tách rắn-lỏng được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10. Tỷ lệ của mỗi steviol glycosit trên TSG trong lá khô (% khối lượng) được đo theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10, và như được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 45

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM
53,6	1,2	4,2	20,5	11,2	1,1	8,2

Các bước gồm keo tụ, tinh chế bằng nhựa, và cô đặc bằng cách làm bay hơi được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10. Chế phẩm steviol glycosit tạo ra được sấy phun, để thu được sản phẩm tinh chế thô. Tỷ lệ của mỗi steviol glycosit trên TSG (ở đây bao gồm tám loại, RebA, RebB, RebC, RebD, steviosit, RebF, RebM, và RebN) trong sản phẩm tinh chế thô sau khi sấy phun (% khối lượng) là như sau. Tỷ lệ của TSG trên mỗi sản phẩm tinh chế thô là 95,75%.

Bảng 46

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM	RebN
49,4	0,4	4,6	14,8	13,4	1,1	5,7	3,4

Quá trình kết tinh được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 9 ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận. Độ siêu bão hòa của RebA (10°C) là 5,7 và độ siêu bão hòa của RebD (10°C) là 160,1.

Bảng 47

Các thông số kết tinh sơ cấp	
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 1538ml
Lượng sản phẩm kết tinh sơ cấp được bổ sung	179,79g
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	55°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C
Thời gian	7,5 giờ
Tốc độ khuấy trộn	200rpm
Profin nhiệt độ	không kiểm soát
Mầm tinh thể (RebD)	Cs=0,08

Quá trình kết tinh thứ cấp được thực hiện theo cùng một cách như trong quá trình kết tinh sơ cấp ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận.

Bảng 48

Các thông số kết tinh thứ cấp	
Lượng sản phẩm kết tinh sơ cấp được bổ sung	Khoảng 42g
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 715ml
Tỷ lệ của RebD với dung môi	3,4% khối lượng
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	55°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C
Thời gian	24 giờ
Tốc độ khuấy trộn	200rpm
Profin nhiệt độ	không kiểm soát
Mầm tinh thể	-

Độ tinh khiết và độ siêu bão hòa của mỗi thành phần, và tỷ lệ sản lượng của RebA trên mỗi bước đơn vị-tỷ lệ sản lượng của RebD trên mỗi bước đơn vị được tính theo cùng một cách như trong các ví dụ thử nghiệm 10 đến 12. Các kết quả được thể hiện trong các bảng dưới đây. Trong lúc độ tinh khiết lớn hơn 100% được thể hiện trong các bảng dưới đây, lý do cho điều này được cho là vì trọng lượng được tăng lên do dung môi còn lại hoặc có bất kỳ sai số phân tích nào.

Bảng 49

Độ tinh khiết của RebA trước khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ tinh khiết của RebD trước khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ tinh khiết của TSG trước khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ quá bão hòa σ (RebA) ở 10°C	Độ quá bão hòa σ (RebD) ở 10°C	$\sigma(D)/\sigma(A)$	Độ tinh khiết của RebA sau khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ tinh khiết của RebD sau khi kết tinh thứ cấp (%)	Tỷ lệ sản lượng của RebD trên mỗi bước đơn vị (%)
21,8	55,1	112,8	0,6433	334,25	519,6	11,5	84,9	85,7

Bảng 50

	Dung môi	Lượng dung môi (ml)	Mầm tinh thể (mg)	Nhiệt độ (ban đầu)	Nhiệt độ (kết thúc)	Thời gian (giờ)	Độ tinh khiết của RebD (%)
Kết tinh lần thứ nhất	EtOH 90%	1538,6	1957	55	10	7,5	55,1
Kết tinh lần thứ hai	EtOH 90%	715	-	55	10	24	85,0

Ví dụ thử nghiệm 16

Quá trình chiết và quá trình tách rắn-lỏng được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10. Tỷ lệ của mỗi steviol glycosit trên TSG trong lá khô (% khối lượng) được đo theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10, và như được thể hiện trong bảng dưới đây.

Bảng 51

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM
68,4	1,0	5,4	9,2	7,8	1,5	6,6

Các bước gồm keo tụ, tinh chế bằng nhựa, và cô đặc bằng cách làm bay hơi được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 10. Chế phẩm steviol glycosit tạo ra được sấy phun, để thu được sản phẩm tinh chế thô. Tỷ lệ thành phần của sản phẩm tinh chế thô sau khi sấy phun (% khối lượng) là như sau.

Bảng 52

RebA	RebB	RebC	RebD	Steviosit	RebF	RebM	Chất khác
64,8	0,6	5,5	8,1	9,1	1,3	4,7	6,0

Quá trình kết tinh sơ cấp được thực hiện theo cùng một cách như trong ví dụ thử nghiệm 9 ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận.

Bảng 53

Các thông số của quá trình kết tinh sơ cấp	
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 1117ml
Tỷ lệ của RebD với dung môi	1,6% khối lượng
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	55°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C
Thời gian	7,5 giờ
Tốc độ khuấy trộn	350rpm
Profin nhiệt độ	có kiểm soát
Mầm tinh thể (RebD)	Cs=0,08

Quá trình kết tinh thứ cấp được thực hiện theo cùng một cách như trong quá trình kết tinh sơ cấp ngoại trừ rằng các điều kiện trong bảng dưới đây được chấp nhận.

Bảng 54

Các thông số kết tinh thứ cấp	
Dung môi	EtOH 90% khối lượng, 715ml
Lượng RebA trong sản phẩm kết tinh sơ cấp được bổ sung	5,915g
Lượng RebD trong sản phẩm kết tinh sơ cấp được bổ sung	14,442g
Nhiệt độ chất lỏng (bắt đầu)	55°C
Nhiệt độ chất lỏng (kết thúc)	10°C
Thời gian	24 giờ
Tốc độ khuấy trộn	350rpm
Profin nhiệt độ	có kiểm soát
Mầm tinh thể (RebD)	Cs=0,08

Độ tinh khiết và độ siêu bão hòa của mỗi thành phần, và tỷ lệ sản lượng của RebA trên mỗi bước đơn vị-tỷ lệ sản lượng của RebD trên mỗi bước đơn vị được tính theo cùng một cách như trong các ví dụ thử nghiệm 10 đến 12. Các kết quả được thể hiện trong bảng dưới đây. Trong lúc độ tinh khiết lớn hơn 100% được thể hiện trong các bảng dưới đây, lý do cho điều này được cho là vì trọng lượng được tăng lên do dung môi còn lại hoặc có bất kỳ sai số phân tích nào.

Bảng 55

Độ tinh khiết của RebA trước khi kết tinh sơ cấp (% khối lượng)	Độ tinh khiết của RebD trước khi kết tinh sơ cấp (% khối lượng)	Độ tinh khiết của TSG trước khi kết tinh sơ cấp (% khối lượng)	Độ quá bão hòa σ (RebA) trước khi kết tinh sơ cấp	Độ quá bão hòa σ (RebD) trước khi kết tinh sơ cấp	$\sigma(D)/\sigma(A)$	Độ tinh khiết của RebA sau khi kết tinh sơ cấp (% khối lượng)	Độ tinh khiết của RebD sau khi kết tinh sơ cấp (% khối lượng)	Tỷ lệ sản lượng của RebA trên mỗi bước đơn vị trong quá trình kết tinh sơ cấp (%)	Tỷ lệ sản lượng của RebD trên mỗi bước đơn vị trong quá trình kết tinh sơ cấp (%)
64,8	8,1	94	14,7	161,2	11,0	26,0	63,4	4,1	82,5

Độ tinh khiết của RebA trước khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ tinh khiết của RebD trước khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ tinh khiết của TSG trước khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ quá bão hòa σ (RebA) ở 10°C	Độ quá bão hòa σ (RebD) 10°C	$\sigma(D)/\sigma(A)$	Độ tinh khiết của RebA sau khi kết tinh thứ cấp (%)	Độ tinh khiết của RebD sau khi kết tinh thứ cấp (%)	Tỷ lệ sản lượng của RebA trên mỗi bước đơn vị (%)	Tỷ lệ sản lượng của RebD trên mỗi bước đơn vị (%)
26,0	63,4	109,5	0,00027	202,348	749437,0	4,0	92,2	97,7	

Bảng 56

	Dung môi	Lượng dung môi (ml)	Mầm tinh thể (mg)	Nhiệt độ (ban đầu)	Nhiệt độ (kết thúc)	Thời gian (giờ)	Độ tinh khiết của RebD (%)
Kết tinh lần thứ nhất	EtOH 90%	1117,1	1240	55	10	7,5	63,4
Kết tinh lần thứ hai	EtOH 90%	715	1149	55	10	24	92,2

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất sản phẩm kết tinh chứa rebaudiosit D bằng cách sử dụng sản phẩm tinh chế thô thu được bằng cách tinh chế thô phần chiết từ cây cỏ ngọt, trong đó:

tổng hàm lượng steviol glycosit của sản phẩm tinh chế thô nằm trong khoảng từ 50 đến 95% khối lượng và sản phẩm tinh chế thô chứa ít nhất rebaudiosit A và rebaudiosit D, trong đó hàm lượng rebaudiosit A nằm trong khoảng từ 20 đến 70% khối lượng trong sản phẩm tinh chế thô,

phương pháp này bao gồm:

bước trộn sản phẩm tinh chế thô trong dung môi chứa metanol hoặc etanol sao cho độ siêu bão hòa ở 10°C của rebaudiosit D lớn hơn hoặc bằng 10 và độ siêu bão hòa ở 10°C của rebaudiosit A nhỏ hơn hoặc bằng 18, để điều chỉnh dung dịch dùng để kết tinh, và

bước làm nguội dung dịch dùng để kết tinh bằng cách khuấy trộn, để kết tủa rebaudiosit D, và

trong đó hàm lượng của rebaudiosit D cao hơn so với hàm lượng của rebaudiosit A trong sản phẩm tinh chế chứa rebaudiosit D.

2. Phương pháp sản xuất theo điểm 1, trong đó tổng steviol glycosit tương ứng với rebaudiosit A, rebaudiosit B, rebaudiosit C, rebaudiosit D, steviosit, rebaudiosit F và rebaudiosit M.

3. Phương pháp sản xuất theo điểm 1 hoặc 2, trong đó hàm lượng của rebaudiosit D nằm trong khoảng từ 2 đến 70% khối lượng trong sản phẩm tinh chế thô.

4. Phương pháp sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nồng độ của metanol hoặc etanol trong dung môi nhỏ hơn hoặc bằng 99,9% khối lượng.

5. Phương pháp sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó dung môi được giữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40 đến 80°C trong bước trộn sản phẩm

tinh chế thô.

6. Phương pháp sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó rebaudiosit D được sử dụng làm mầm tinh thể.

7. Phương pháp sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó dung dịch dùng để kết tinh được làm nguội đến nhiệt độ nhỏ hơn hoặc bằng 35°C bằng cách khuấy trộn, để kết tủa rebaudiosit D.

8. Phương pháp sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó dung dịch dùng để kết tinh được làm nguội ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,002 đến 1,37°C/phút bằng cách khuấy trộn, để kết tủa rebaudiosit D.

9. Phương pháp sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó dung dịch dùng để kết tinh được làm nguội trong khoảng thời gian từ 1 đến 48 giờ bằng cách khuấy trộn, để kết tủa rebaudiosit D.

10. Phương pháp sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó sản phẩm tinh chế thô thu được bằng phương pháp bao gồm:

bước chiết để chiết lá khô của cây cỏ ngọt bằng dung môi để thu được phần chiết,

bước tách rắn-lỏng để xử lý tách rắn-lỏng phần chiết để thu được chất lỏng đã được làm trong,

bước keo tụ để bổ sung chất kết tụ vào chất lỏng đã được làm trong để làm keo tụ, để thu được chất lỏng xử lý,

bước tinh chế bằng nhựa để xử lý chất lỏng xử lý bằng nhựa xốp kỵ nước, và

bước cô đặc để cô đặc dung dịch sau khi tinh chế bằng nhựa.

11. Phương pháp sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, còn bao gồm bước tách rebaudiosit D kết tủa và pha lỏng, và làm khô rebaudiosit D tách được.

12. Phương pháp sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, còn bao gồm:

bước tách và làm khô rebaudiosit D kết tủa, để thu được sản phẩm kết tinh sơ cấp,

bước trộn sản phẩm kết tinh sơ cấp trong dung môi chứa metanol hoặc etanol sao cho độ siêu bão hòa ở 10°C của rebaudiosit D lớn hơn hoặc bằng 10 và độ siêu bão hòa ở 10°C của rebaudiosit A nhỏ hơn hoặc bằng 18, để điều chỉnh chất lỏng hòa tan sản phẩm kết tinh sơ cấp,

bước làm nguội chất lỏng hòa tan sản phẩm kết tinh sơ cấp bằng cách khuấy trộn, để kết tủa rebaudiosit D, và

bước tách và làm khô rebaudiosit D kết tủa.

13. Phương pháp sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, trong đó tỷ lệ của rebaudiosit D với tổng steviol glycosit trong sản phẩm kết tinh chứa rebaudiosit D nằm trong khoảng từ 35 đến 95% khối lượng.

14. Phương pháp sản xuất theo điểm 13, trong đó tỷ lệ của rebaudiosit A với tổng steviol glycosit trong sản phẩm kết tinh chứa rebaudiosit D nằm trong khoảng từ 10 đến 50% khối lượng.

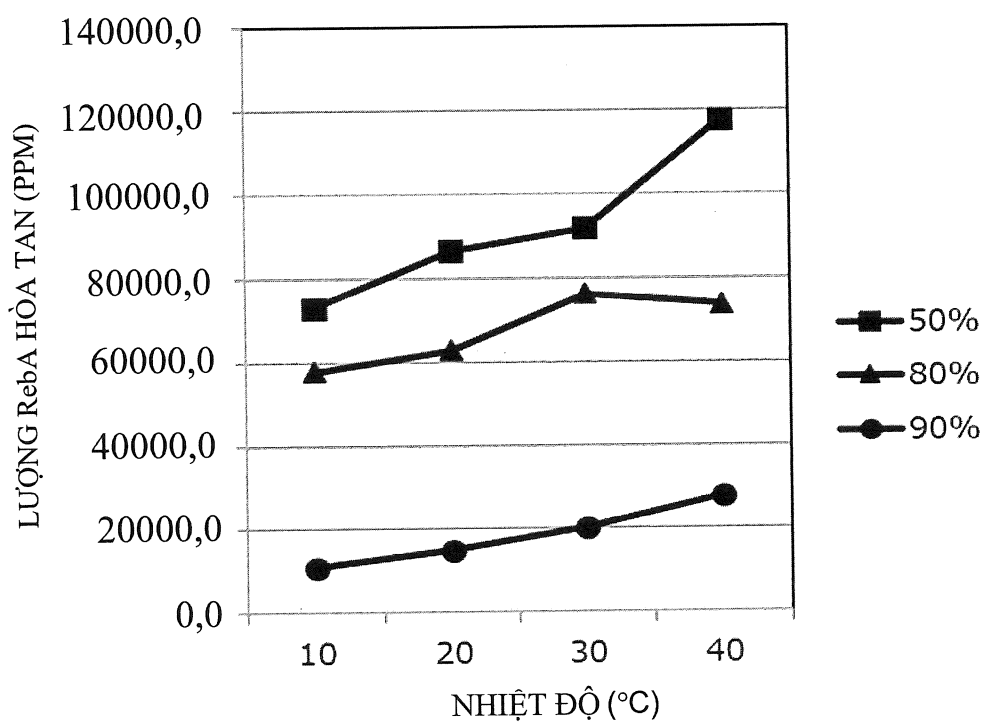
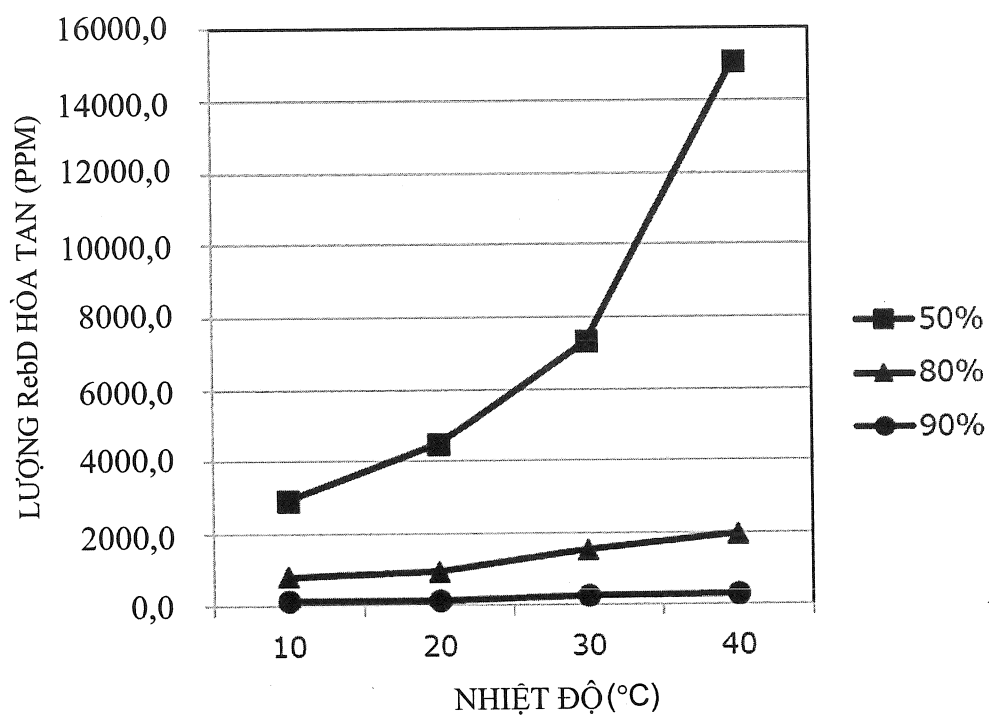
15. Phương pháp sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó tỷ lệ của rebaudiosit D kết tinh, với rebaudiosit D được chứa trong sản phẩm tinh chế thô, trong trường hợp kết tinh đơn, nằm trong khoảng từ 70 đến 99% khối lượng.

16. Phương pháp sản xuất sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm bước bổ sung sản phẩm kết tinh chứa rebaudiosit D được sản xuất bằng phương pháp sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15.

17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó sản phẩm thực phẩm hoặc đồ uống là đồ uống.

1/7

Fig. 1



2/7

Fig. 2

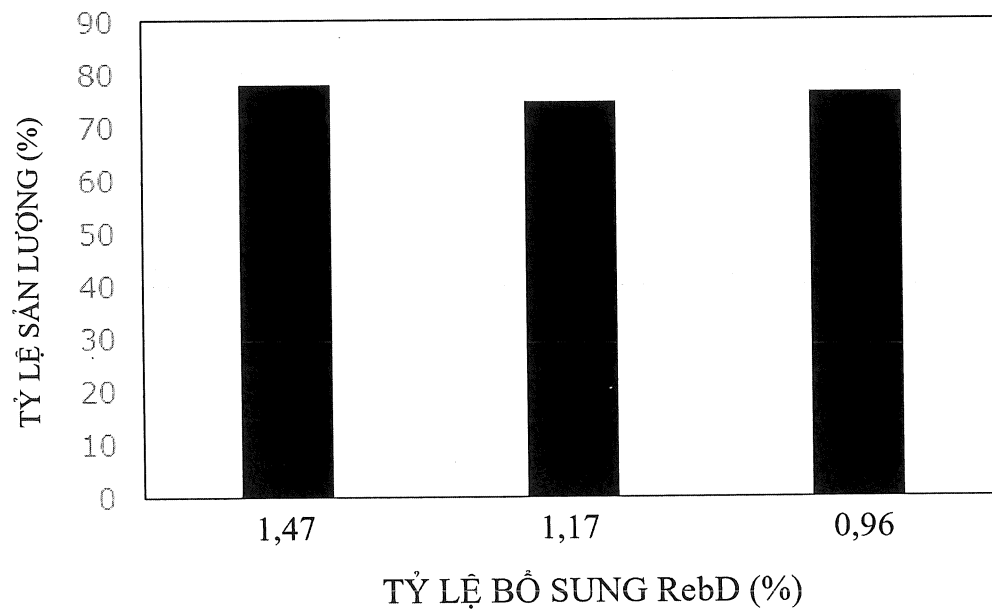
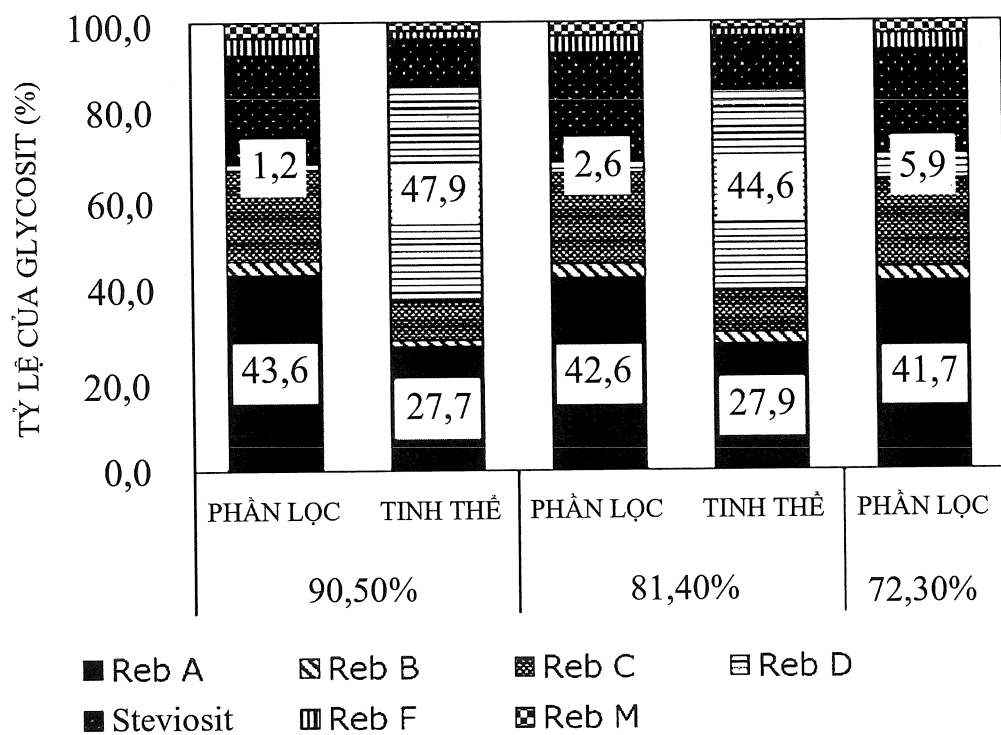


Fig. 3



3/7

Fig. 4

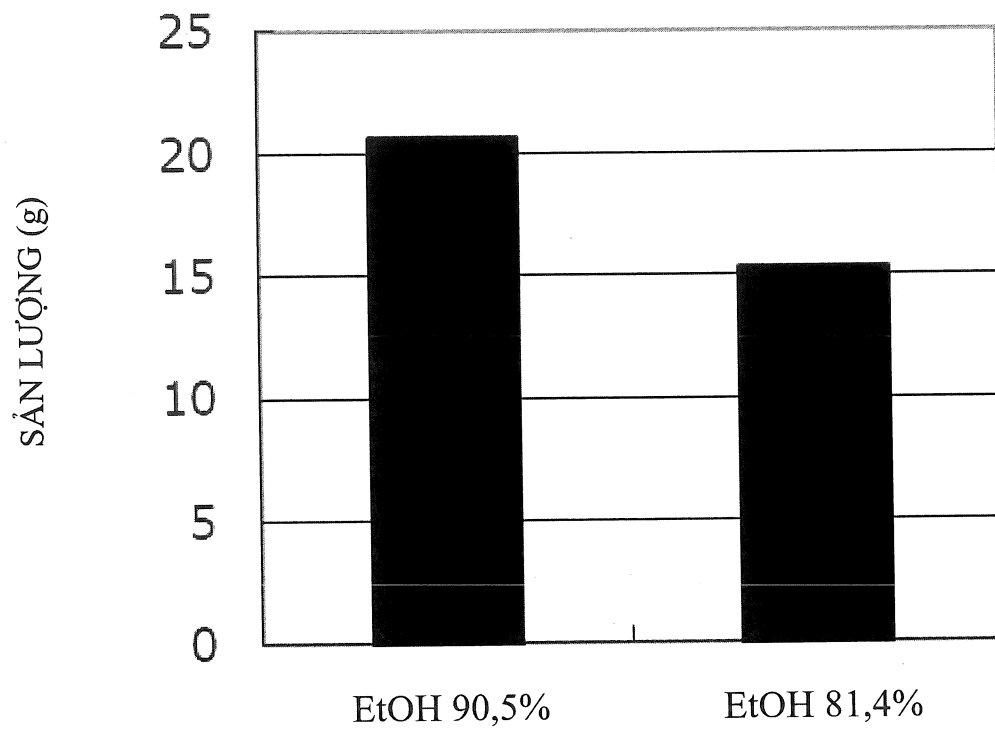
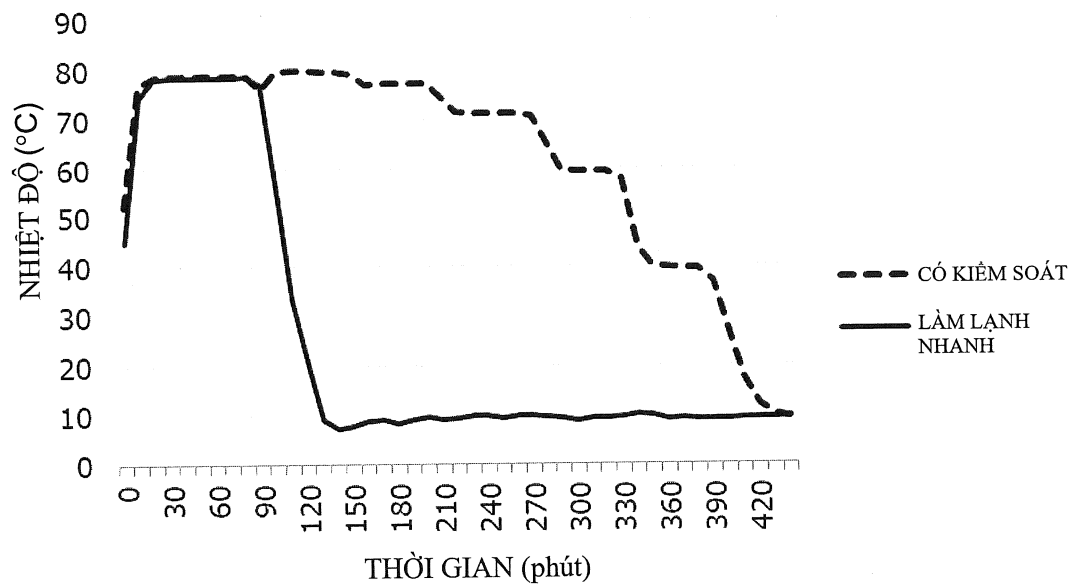


Fig. 5



4/7

Fig. 6

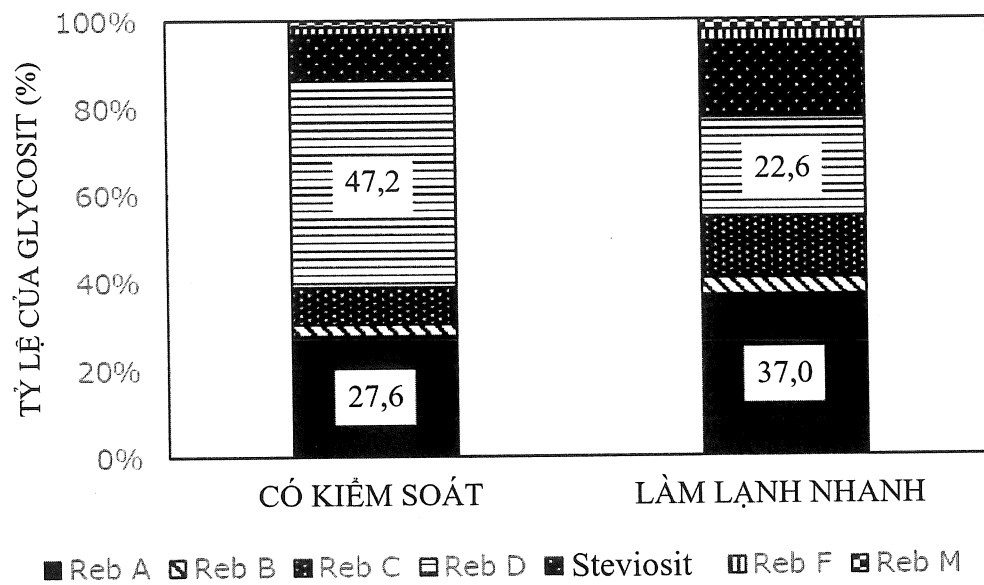
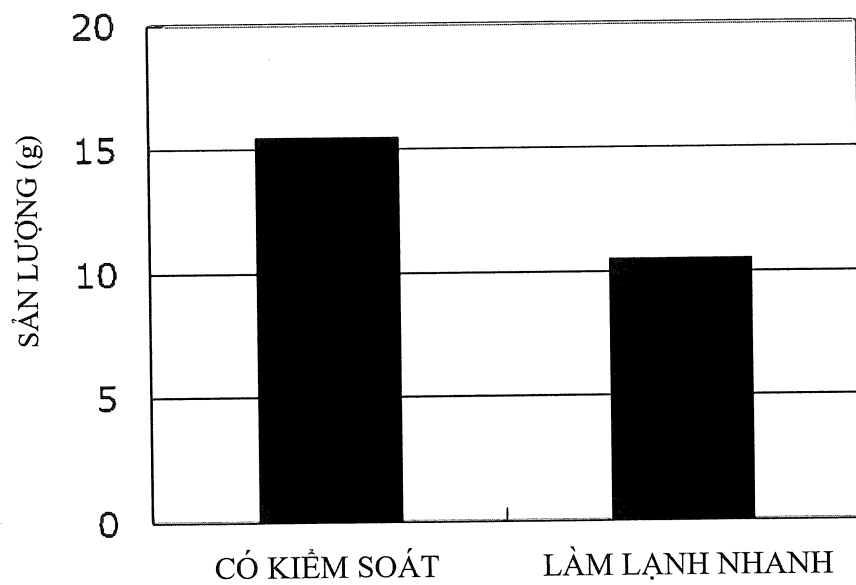


Fig. 7



5/7

Fig. 8

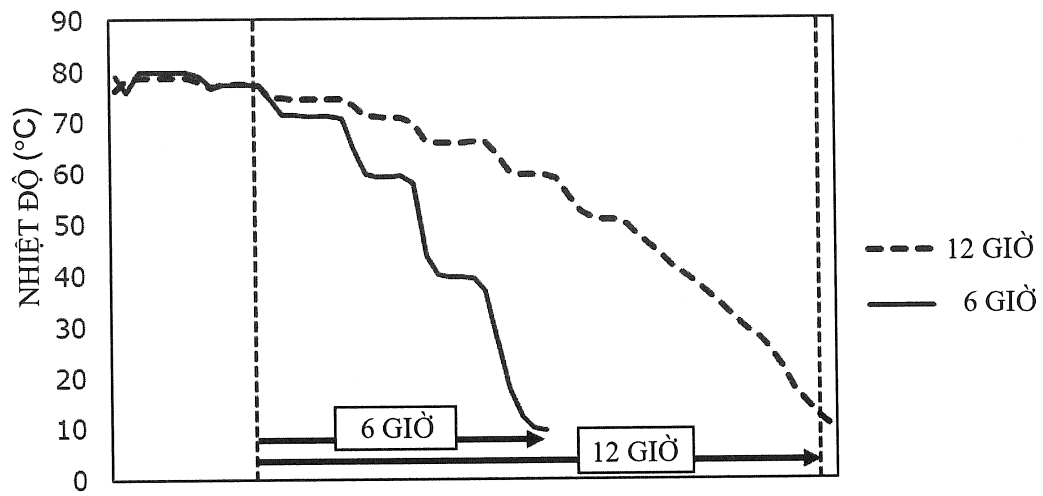
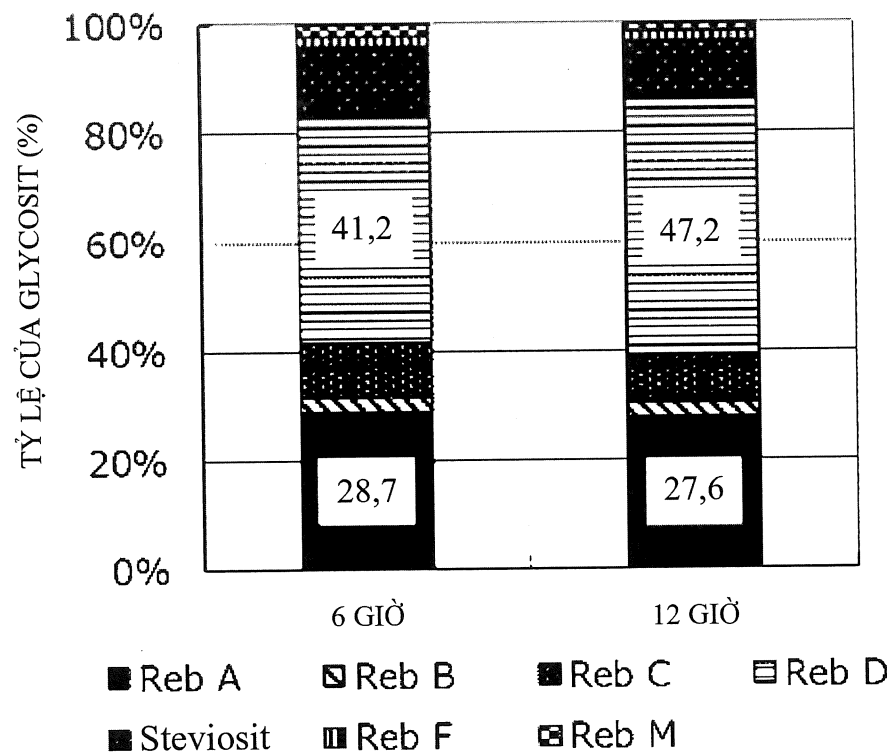


Fig. 9



6/7

Fig. 10

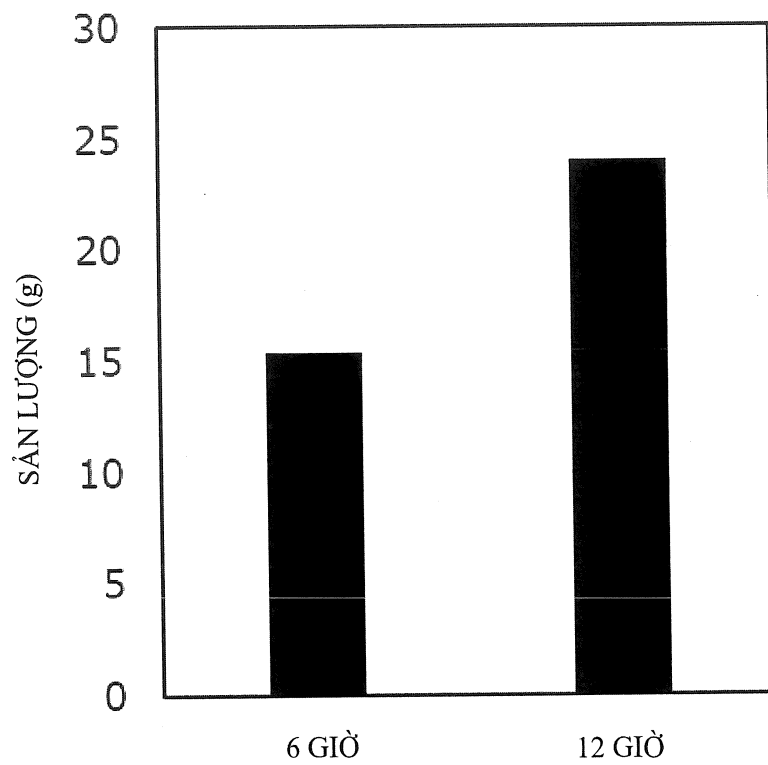
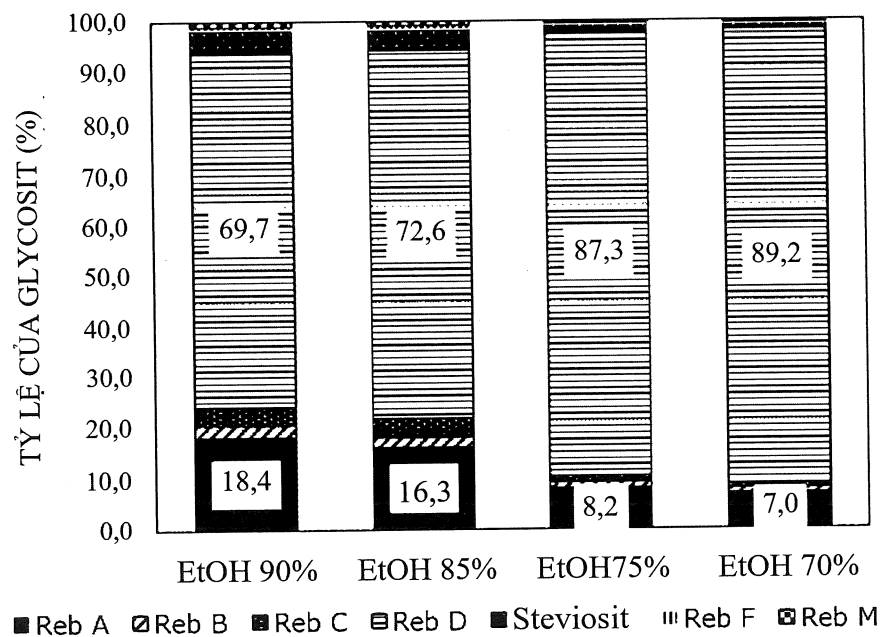


Fig. 11



7/7

Fig. 12

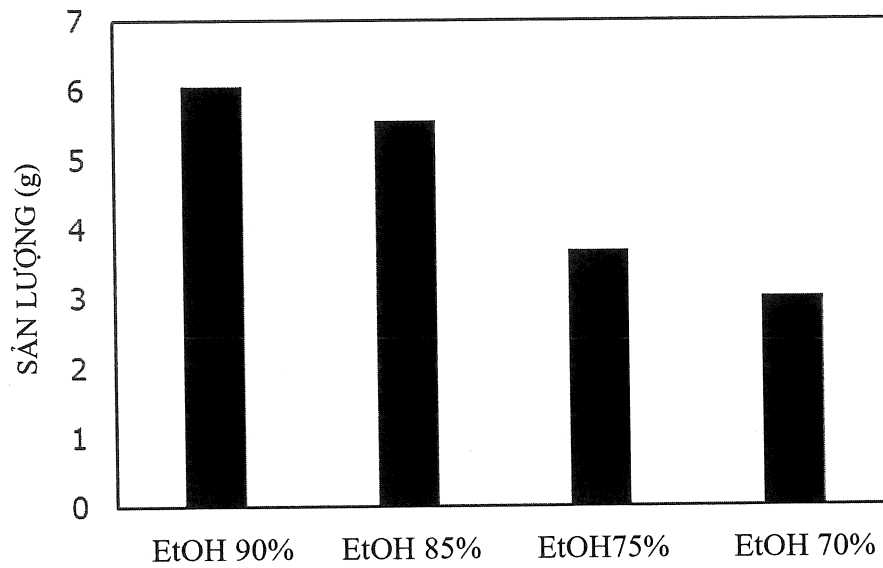


Fig. 13

