(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) **1-0020980**

(51)[7] **C07K 1/107**, 14/47

(13) **B**

(21) 1-2013-00321
(22) 30.06.2010
(86) PCT/IT2010/000287 30.06.2010
(87) WO2012/001712A1 05.01.2012
(45) 27.05.2019 374
(43) 25.04.2013 301
(73) ITALFARMACO SPA (IT)
Viale Fulvio Testi, 330, I-20126 Milano, Italy
(72) Andrea STEVENAZZI (IT), Lorenzo DE FERRA (IT), Barbara PINTO (IT)
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.)

(54) HỢP CHẤT SẮT (III) CASEINSUCXINYLAT, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat có hàm lượng sắt nằm trong khoảng từ 4,5% đến 7% trọng lượng và độ tan trong nước lớn hơn khoảng 92%. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều chế và dược phẩm chứa hợp chất này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat có hàm lượng sắt nằm trong khoảng từ 4,5% đến 7% trọng lượng và độ tan trong nước lớn hơn khoảng 92% và có tỷ lệ trọng lượng của phospho/nitơ lớn hơn 5%. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat và dược phẩm chứa hợp chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các chất dẫn xuất của sắt được sử dụng rộng rãi trong y học để phòng ngừa và điều trị bệnh thiếu máu và bệnh thiếu sắt trong thời kỳ thai nghén, các trường hợp của hội chứng kém hấp thu, bệnh thiếu sắt trong thời kỳ nuôi con bằng sữa mẹ và bệnh thiếu sắt trong quá trình sinh trưởng. Trong số các chất này, sắt protein sucxinylat thường được gọi theo tên viết tắt là IPS (iron protein succinylate) có đặc tính nổi bật về độ sinh khả dụng và khả năng dung nạp của nó.

Các đặc tính hóa học, lý học và sinh học cũng như phương pháp điều chế IPS, còn được gọi là Ironlat, thu được từ protein sữa đã được mô tả trong patent Ý số IT1150213. Ngoài ra, ở độ pH>5, Ironlat chỉ tan một phần đối với phức chất chứa 6,7% sắt và tan hoàn toàn đối với phức chất chứa 4,6% sắt.

Trong Tạp chí quốc tế về liệu pháp dược lý học và độc chất học trong lâm sàng, tập 31 (1993), trang 40-51, Cremonesi và các đồng tác giả mô tả các đặc tính hóa học và dược lý học của hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat, phức chất sắt (III) thu được từ casein sucxinyl hóa. Trong thử nghiệm *in vivo*, sản phẩm này có hàm lượng sắt bằng 5%, cho thấy có khả năng dung nạp tốt hơn qua đường dạ dày-ruột so với dẫn xuất khác của sắt.

Patent châu Âu số EP939083B1 mô tả phương pháp điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat bao gồm việc sử dụng quá trình làm khô và nghiền nhỏ đặc

hiệu để khắc phục vấn đề do sự có mặt của các thành phần không tan trong sản phẩm. Ngoài ra, tài liệu này còn mô tả việc sử dụng casein loại dùng trong thực phẩm làm nguyên liệu để sử dụng trong quy trình điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat.

Để góp phần duy trì sản phẩm trong khoảng giới hạn cụ thể liên quan đến sự nhiễm vi sinh vật, các chất bảo quản là metyl paraben và propyl paraben được cho thêm trong quy trình này; khi phân tích sản phẩm cuối, xác định được nồng độ tương ứng của các chất này là 3% và 1,05%. Việc sử dụng các chất bảo quản này cũng được mô tả trong patent châu Âu số EP1776382B1, tài liệu này mô tả cách sử dụng phương pháp tạo hạt ẩm kết hợp với việc sấy phun hoặc làm đông khô nhanh sản phẩm để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình hòa tan trong quy trình này.

Đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP319664 đề xuất phương pháp dựa trên quá trình thoái biến hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat bằng enzym để khắc phục các vấn đề về độ tan và độ nhớt quan sát được trong phức chất này, cụ thể là khi tỷ lệ hàm lượng sắt cụ thể vượt quá 10%.

Công bố đơn quốc tế số WO2007/065812 mô tả phương pháp điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat bằng cách tiến hành cả phản ứng sucxinylat hóa và quá trình tạo phức sau đó bằng cách sử dụng ion sắt (III) để tiến hành việc tạo huyền phù, trong khi các khía cạnh liên quan đến việc khó hòa tan sắt (III) caseinsucxinylat lại không được khắc phục. Trên thực tế, tài liệu này không đưa ra thông tin liên quan đến việc hòa tan phức chất thu được và có thể không xác định được độ nhớt của dung dịch thu được.

Các vấn đề hòa tan này được thấy rất rõ khi tỷ lệ hàm lượng sắt cụ thể vượt quá giới hạn bằng 5%.

Quan sát được hiện tượng tăng độ nhớt khi nồng độ sản phẩm trong dung dịch nước tăng lên, điều này gây khó khăn hoặc thậm chí cản trở việc sử dụng hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat vượt quá nồng độ đã định trước.

Tổ hợp các ảnh hưởng này làm hạn chế liều dùng của sản phẩm đến mức không quá 800mg tương ứng với khoảng 40mg sắt (III)/liều dùng, trừ khi sử dụng

chế phẩm chứa nhiều hơn 15ml dung dịch.

Ngoài ra, độ nhớt của dung dịch nước chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat làm phức tạp hóa quá trình làm giảm hàm lượng vi sinh vật trong sản phẩm bằng cách lọc hoặc vi lọc và cần sử dụng lượng lớn chất bảo quản.

Do đó, rõ ràng là các tài liệu đã biết hiện nay không đưa ra giải pháp đơn giản để khắc phục vấn đề hòa tan hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat, dược chất có hiệu quả tốt trong việc điều trị các dạng khác nhau của bệnh thiếu sắt.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat có hàm lượng sắt nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7% trọng lượng và độ tan trong nước lớn hơn khoảng 92% trọng lượng và có tỷ lệ trọng lượng của phospho/nitơ lớn hơn 5%. Tốt hơn, nếu độ tan trong nước này được cho là độ tan trong khoảng 11,5 phần nước.

Hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat nêu trên còn chứa tạp chất protein với lượng nhỏ hơn khoảng 15%, tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 10% và/hoặc tỷ lệ P/N lớn hơn khoảng 5%, tốt hơn là lớn hơn khoảng 5,5%.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat, bao gồm các bước sau:

a) cho casein và sucxinic anhydrit phản ứng trong nước để thu được casein sucxinyl hóa,

b) cho casein sucxinyl hóa phản ứng với sắt (III) clorua để thu được hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat,

khác biệt ở chỗ, casein trong bước a) nêu trên là casein đã tinh chế, có hàm lượng tạp chất protein và/hoặc tạp chất vô cơ thấp và/hoặc tỷ lệ P/N cao.

Tốt hơn, nếu hàm lượng tạp chất protein nêu trên nhỏ hơn 15% trọng lượng, hàm lượng các tạp chất vô cơ nêu trên nhỏ hơn 1% trọng lượng và tỷ lệ hàm lượng theo trọng lượng của phospho với nitơ lớn hơn 5%.

Tốt hơn nữa nếu hàm lượng tạp chất protein nêu trên nhỏ hơn khoảng 10%

trọng lượng và/hoặc hàm lượng tạp chất vô cơ nêu trên nhỏ hơn khoảng 0,4% trọng lượng và/hoặc tỷ lệ hàm lượng theo trọng lượng của phospho với nitơ lớn hơn khoảng 5,5%.

Các tạp chất protein theo sáng chế nêu trên là các protein không thuộc nhóm bao gồm alpha-S1 casein, alpha-S2 casein, beta casein, kapa casein và/hoặc giả-kapa casein.

Mô tả chi tiết sáng chế

Hiện nay, đã phát hiện được rằng có thể thu được các ưu điểm bất ngờ trong quá trình điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat khi casein trong chế độ ăn - đã tinh chế để loại bỏ các tạp chất protein, tạp chất vô cơ và/hoặc làm tăng tỷ lệ phospho/nitơ (tỷ lệ P/N) - được sử dụng làm nguyên liệu. Do đó, trên thực tế, có thể thu được hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat không những có profin protein chứa hàm lượng tạp chất thấp mà còn bất ngờ có độ tan trong nước được cải thiện. Độ tan được cải thiện này làm cho có thể thu được dung dịch và/hoặc huyền phù trong nước có độ nhớt nhỏ hơn so với độ nhớt thu được từ casein loại dùng trong thực phẩm có bán trên thị trường.

Liên quan đến casein, thuật ngữ "tạp chất protein" theo sáng chế dùng để chỉ các protein không là casein ở các biến thể khác nhau của nó, được xác định bằng phương pháp điện di một chiều có nhuộm thuốc nhuộm Coomassie màu xanh da trời và phương pháp phân tích đo tỷ trọng. Tốt hơn, nếu các tạp chất protein theo sáng chế là các protein không thuộc nhóm bao gồm alpha-S1 casein, alpha-S2 casein, beta casein, kapa casein và/hoặc giả-kapa casein.

Tương tự, liên quan đến hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat, thuật ngữ "tạp chất protein" theo sáng chế dùng để chỉ các chất không là casein được sucxinyl hóa ở các biến thể khác nhau của nó, được xác định bằng phương pháp điện di một chiều có nhuộm thuốc nhuộm Coomassie màu xanh da trời và phương pháp phân tích đo tỷ trọng. Tốt hơn, nếu các tạp chất protein theo sáng chế nêu trên là các protein được sucxinylat hóa không thuộc nhóm các sản phẩm sucxinylat hóa của

alpha-S1 casein, alpha-S2 casein, beta casein, kapa casein và/hoặc giả-kapa casein.

Thuật ngữ "các tạp chất vô cơ" theo sáng chế dùng để chỉ các hợp chất tro được sulphat hóa.

Thuật ngữ "tỷ lệ P/N" dùng để chỉ tỷ lệ giữa lượng phospho theo trọng lượng có mặt trong mẫu xác định được bằng kỹ thuật ICP và lượng nitơ theo trọng lượng xác định được bằng phương pháp phân tích nguyên tố.

Theo sáng chế, các giá trị được thể hiện theo tỷ lệ % trọng lượng (% trọng lượng) sẽ được hiểu là so với tổng trọng lượng của hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat hoặc của casein.

Thông thường, các casein trong chế độ ăn được xác định theo kỹ thuật làm kết tủa được sử dụng trong quy trình điều chế chúng: việc làm kết tủa các axit casein được tiến hành bằng cách axit hóa, trong khi các chất này thu được bằng cách sử dụng enzym renin là presamic, còn được gọi là renin casein.

Theo sáng chế, casein trong chế độ ăn được sử dụng làm nguyên liệu có thể là axit casein hoặc presamic casein.

Các sản phẩm có bán trên thị trường, bất kể loại (axit hoặc presamic) thường ít có thông tin phân tích kèm theo; các thông số thường được thể hiện là hàm lượng nước, hàm lượng protein (được xác định bằng cách sử dụng hệ số nhân so với tổng hàm lượng nitơ), mức độ nhiễm vi sinh vật và cỡ hạt. Mức đặc trưng này hoàn toàn thích hợp cho việc sử dụng các casein trong ngành thực phẩm, nhưng hiện nay các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng việc điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat cần có đánh giá phân tích sâu hơn về nguyên liệu này.

Các casein trong chế độ ăn và casein đã tinh chế có bán trên thị trường được dùng làm nguyên liệu theo sáng chế để điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat được phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng ở áp suất cao (HPLC) pha ngược theo phương pháp được Bonizzi và các đồng tác giả thể hiện trong tài liệu *Journal of Chromatography A* vol. 1261 (2009), trang 165-168.

Do đó, có thể xác định ba loại casein là alpha-S1, alpha-S2, beta, kapa và giả

kappa.

Bằng cách phân tích điện di, cả điện di một chiều và điện di hai chiều, sử dụng thuốc nhuộm Coomassie màu xanh da trời làm chất chỉ thị thuốc thử, ngoài việc tách các loại casein khác nhau và các dạng khác nhau của chúng thu được từ quá trình cải biến sau phiên mã (như glycosyl hóa và phosphoryl hóa) của chúng, cũng có thể đánh giá sự có mặt của tạp chất protein.

Cụ thể, phương pháp điện di trên gel polyacrylamit có natri dodexyl sulfat (SDS-PAGE) với gel polyacrylamit 14%, nhuộm màu bằng thuốc nhuộm Coomassie màu xanh da trời và phương pháp phân tích đo tỷ trọng dựa trên đường hiệu chỉnh được tạo ra với các lượng BSA khác nhau, được sử dụng để định lượng tạp chất protein.

Các casein nêu trên và casein đã tinh chế còn được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp tro sulphat hóa theo Dược điển châu Âu (phương pháp Eu.Pharm. 2.4.14). Sau đó, hàm lượng phospho (P) của nó được xác định bằng kỹ thuật ICP và hàm lượng nitơ (N) được xác định bằng phương pháp phân tích nguyên tố và do đó, tỷ lệ % của P/N được tính bằng cách chia lượng phospho theo trọng lượng quan sát được cho lượng nitơ theo trọng lượng quan sát được và nhân kết quả với 100. Bảng 1 dưới đây thể hiện kết quả thu được đối với các loại casein khác nhau, nghĩa là các casein trong chế độ ăn (axit và presamic) có bán trên thị trường và các casein đã tinh chế theo phương pháp của sáng chế.

Bảng 1

Casein	Nguyên liệu dùng cho	Tạp chất protein	Tro sulphat hóa	Tỷ lệ % P/N
Axit casein	Ví dụ so sánh 1 và 2	15%	1,6%	
Presamic casein	Ví dụ so sánh 3	20%	9,2%	
Ví dụ 4	Ví dụ 8A và 9A	5%	0,4%	5,5%
Ví dụ 5	Ví dụ 8B	9%	0,9%	5,1%
Ví dụ 6	Ví dụ 8C	8%	0,2%	5,6%
Ví dụ 7	Ví dụ 8D và 9B	10%	0,8%	5,2%

Kết quả phân tích các casein trong chế độ ăn có bán trên thị trường cho thấy rằng hàm lượng tạp chất protein nằm trong khoảng 15-20% tổng lượng protein mẫu, trong khi mức hàm lượng của các tạp chất vô cơ xác định được bằng giá trị hàm lượng tro sulphat hóa chứa các axit casein có bán trên thị trường với lượng từ 1% đến 2,5% trọng lượng và các presamic casein với lượng từ 7% đến 10% trọng lượng, như được thể hiện làm ví dụ trong Bảng 1 trên đây.

Do đó, một mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp tinh chế casein trong chế độ ăn nêu trên để loại bỏ một phần hoặc toàn bộ các tạp chất protein, tạp chất vô cơ và/hoặc làm tăng tỷ lệ P/N.

Theo sáng chế, casein trong chế độ ăn nêu trên được xử lý bằng nước, dung môi hữu cơ phân cực hoặc hỗn hợp của chúng; tốt hơn là bằng nước.

Tốt hơn, nếu dung môi hữu cơ phân cực nêu trên là rượu có từ 1 đến 4 nguyên từ cacbon, tốt hơn nữa nếu là metanol, etanol, isopropanol hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo phương án thứ nhất của sáng chế, dung môi đã chọn được dùng để tinh chế casein theo cách hòa tan các tạp chất protein và tạp chất vô cơ để tách chúng ra

khỏi casein không tan bằng cách ly tâm hoặc lọc. Đặc tính tan của casein trong dung môi đã chọn là một hàm số của nhiệt độ, độ pH và/hoặc lượng chất phụ gia thêm vào, ví dụ, natri clorua, canxi clorua và/hoặc amoni axetat, được sử dụng để tiến hành phương pháp tinh chế này.

Casein trong chế độ ăn được sử dụng trong quá trình tinh chế có thể được cho tiếp xúc trực tiếp với dung môi đã chọn trong điều kiện hòa tan protein và các tạp chất vô cơ, và sau một khoảng thời gian tiếp xúc thích hợp trong khi khuấy, chất này được tách ra khỏi dung dịch chứa các tạp chất bằng cách lọc hoặc ly tâm.

Theo phương án thứ hai của sáng chế, việc tinh chế sẽ được thực hiện bằng cách: trước tiên, hòa tan casein trong dung môi đã chọn và sau đó làm kết tủa chất này bằng cách điều chỉnh thích hợp đối với độ pH, nhiệt độ và/hoặc lượng chất phụ gia thêm vào, ví dụ như natri clorua, canxi clorua và/hoặc amoni axetat. Thậm chí trong trường hợp này, việc tách casein ra khỏi protein và các tạp chất vô cơ sẽ được thực hiện bằng cách lọc hoặc ly tâm, các tạp chất này trở nên hòa tan được trong dung môi dùng để tinh chế.

Theo phương án thứ nhất nêu trên của sáng chế, casein trong chế độ ăn được cho tiếp xúc với dung môi đã chọn, hỗn hợp này được tùy ý điều chỉnh để độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 5, hoặc nằm trong khoảng từ 5 đến 10. Việc điều chỉnh độ pH này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng dung dịch nước chứa axit clohydric hoặc natri hydroxit. Hỗn hợp nêu trên được điều chỉnh để nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 40°C, tốt hơn là từ 0°C đến 10°C. Chất phụ gia, ví dụ, natri clorua, canxi clorua và/hoặc amoni axetat có thể tùy ý được thêm vào. Hỗn hợp tạo thành được tiếp tục khuấy trong khoảng thời gian từ 1 đến 24 giờ, tốt hơn là từ 2 đến 10 giờ.

Do đó, dung môi đã chọn nêu trên được sử dụng để hòa tan các tạp chất protein và tạp chất vô cơ và tách chúng ra khỏi casein không tan, tốt hơn nếu sau đó casein được tách ra khỏi các tạp chất bằng cách ly tâm hoặc lọc. Việc lọc có thể được thực hiện theo cách thông thường hoặc bằng cách sử dụng màng có cỡ lỗ

thích hợp theo phương pháp lọc dòng tiếp tuyến hoặc kiểu ngõ cụt. Theo phương án thứ hai nêu trên của sáng chế, casein trong chế độ ăn được hòa tan trong dung môi đã chọn, sau đó chất này được làm kết tủa để độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 6, tốt hơn là từ 4,5 đến 5. Phương pháp bất kỳ mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết có thể được sử dụng để tách casein ra khỏi dung dịch chứa protein và các tạp chất vô cơ, tốt hơn nếu casein nêu trên được tách bằng cách lọc hoặc ly tâm.

Để thu được độ tinh khiết mong muốn, các bước tinh chế có thể được lặp lại một hoặc vài lần. Do đó, chính phương pháp tinh chế này có thể được lặp lại hoặc tùy ý thực hiện các phương pháp tinh chế theo trình tự khác nhau.

Do đó, sáng chế đề cập đến casein trong chế độ ăn đã tinh chế có thể thu được bằng một trong số các phương pháp theo sáng chế đã mô tả trên đây, tốt hơn là có hàm lượng tạp chất protein nhỏ hơn 15% trọng lượng, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 10% trọng lượng; tốt hơn, nếu hàm lượng các tạp chất vô cơ nhỏ hơn 1% trọng lượng, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 0,4% trọng lượng và/hoặc tỷ lệ giữa hàm lượng theo trọng lượng của phospho và nitơ lớn hơn 5%, tốt hơn nữa là lớn hơn 5,5%.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng casein đã tinh chế nêu trên để điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat.

Việc điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat có thể được thực hiện theo các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ như các phương pháp đã được mô tả trong các patent số IT1150213 và EP939083B1. Theo một phương án của sáng chế, phương pháp điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat đã mô tả trên đây bao gồm các bước:

a) cho casein và anhydrit sucxinic phản ứng trong nước để thu được casein sucxinyl hóa,

b) cho casein sucxinyl hóa phản ứng với sắt (III) clorua để thu được hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat,

trong đó casein trong điểm a) là casein đã tinh chế có hàm lượng các tạp chất protein và/hoặc tạp chất vô cơ thấp và/hoặc tỷ lệ P/N cao như đã mô tả trên đây,

quá trình tinh chế được thực hiện như sau:

Casein đã tinh chế được sucxinyl hóa trong nước bằng cách sử dụng anhydrit sucxinic để duy trì độ pH trong quá trình phản ứng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 7,5 đến 8,5 bằng cách cho thêm dung dịch nước chứa natri hydroxit.

Nhiệt độ phản ứng nằm trong khoảng từ 20 đến 25°C. Khi phản ứng kết thúc, sản phẩm được làm kết tủa bằng cách cho thêm - trong khi khuấy - dung dịch nước chứa axit clohydric đến khi độ pH bằng khoảng 3.

Do đó, casein sucxinyl hóa thu được được lọc và hòa tan trong nước bằng cách cho thêm dung dịch nước chứa natri hydroxit. Dung dịch này được lọc để có thể tách các chất rắn không tan; sau đó, dung dịch nước chứa sắt (III) clorua được cho thêm với lượng xác định theo hàm số của hàm lượng sắt mong muốn trong sản phẩm cuối.

Trong khi cho thêm, độ pH giảm đi và sắt (III) caseinsucxinylat kết tủa.

Trong quá trình cho thêm dung dịch sắt (III) clorua, độ pH có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng dung dịch nước chứa natri hydroxit để tránh tình trạng môi trường có tính axit quá mức. Trong trường hợp này, sau khi cho thêm sắt (III) clorua, phức chất được làm kết tủa hoàn toàn bằng cách cho thêm dung dịch nước chứa axit clohydric.

Chất rắn tạo thành được thu hồi bằng cách lọc và được tạo huyền phù trong nước. Trong bước này, có thể cho thêm các chất bảo quản (metyl paraben và propyl paraben). Dung dịch nước chứa natri hydroxit được thêm vào để độ pH bằng khoảng 8,5, các chất không tan được loại bỏ bằng cách ly tâm và sắt (III) caseinsucxinylat được làm kết tủa bằng cách axit hóa sử dụng axit clohydric trong dung dịch nước. Sản phẩm thu được được làm khô ở áp suất thấp.

Theo cách khác, để làm khô ở áp suất thấp, có thể thu được sắt (III) caseinsucxinylat từ dung dịch nước của nó bằng cách sấy phun.

Phương pháp nêu trên có thể còn bao gồm bước bổ sung là vi lọc dung dịch nước chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat. Bước vi lọc theo sáng chế này được

dự định để làm giảm mức độ nhiễm vi sinh vật.

Hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat theo sáng chế này có đặc tính tan trong nước được cải thiện so với đặc tính tan của nó theo các giải pháp đã biết; tốt hơn, nếu hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat này có độ tan trong nước lớn hơn khoảng 92%. Tốt hơn, nếu giá trị độ tan này được dự định trong 11,5 phần nước.

Việc tính độ tan trong nước được thực hiện bằng cách hòa tan mẫu ở độ pH bằng khoảng 8,0 sử dụng natri hydroxit với tỷ lệ cuối của nước và sắt (III) caseinsucxinylat bằng 11,5 theo trọng lượng và lọc hỗn hợp này bằng bộ lọc có cỡ lỗ 6μm, xác định trọng lượng chất không tan còn lại trên bộ lọc sau khi làm khô. Tỷ lệ % độ tan của mẫu được tính bằng cách lấy trọng lượng của chính mẫu này trừ đi trọng lượng của thành phần còn lại trên bộ lọc và so sánh kết quả với trọng lượng ban đầu của mẫu. Độ nhớt của các chế phẩm trong nước khác nhau được xác định ở độ pH của sản phẩm bằng khoảng 8,0 có nồng độ cuối bằng 5%, 6% và 8% trọng lượng.

Ngoài ra, xác định tốc độ lọc dựa trên màng có cỡ lỗ 0,45μm để đánh giá khả năng làm giảm mức độ nhiễm vi sinh vật bằng cách vi lọc đối với các mẫu thu được khác nhau. Việc tính toán này được thực hiện bằng cách xác định thời gian cần thiết để 5ml dung dịch mẫu trong nước ở độ pH bằng khoảng 8,0 có nồng độ 5% trọng lượng đi qua màng có cỡ lỗ 0,45μm với diện tích 3cm^2 trong hệ thống chân không.

Bảng 2 dưới đây thể hiện các kết quả thu được.

Bảng 2

Mẫu	Độ tan trong 11,5 phần nước	Độ nhớt của dung dịch (mPa·s)			Thời gian lọc 5ml dung dịch 5% trong nước với bộ lọc có cỡ lỗ 0,45μm (giây)
		5% trong nước	6% trong nước	8% trong nước	
Ví dụ so sánh 1	89%	17	54	715	∞ (bị tắc)
Ví dụ so sánh 2	84%	21	67	957	∞ (bị tắc)

Ví dụ so sánh 3	85%	17	53	863	560
Ví dụ 8A	97%	14	29	207	120
Ví dụ 8B	94%	13	33	351	150
Ví dụ 8C	98%	11	24	195	90
Ví dụ 8D	93%	15	44	387	180
Ví dụ 9A	98%	12	28	240	180
Ví dụ 9B	92%	14	36	411	120

Một mục đích khác của sáng chế là dược phẩm chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat thu được theo sáng chế và ít nhất một tá dược chấp nhận được về mặt dược lý.

Tốt hơn, nếu dược phẩm này có thể được bào chế ở dạng rắn hoặc dạng lỏng, tốt hơn nữa là ở dạng lỏng. Tốt hơn, nếu dạng lỏng này là dung dịch hoặc huyền phù, tốt hơn nữa nếu là dung dịch nước. Dung dịch nước này có thể được sử dụng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa.

Tốt hơn, nếu dược phẩm nêu trên chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 200mg sắt, tốt hơn nữa là từ 20 đến 100mg sắt, đặc biệt tốt hơn là khoảng 40mg, 60mg hoặc 80mg sắt.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, dược phẩm nêu trên ở dạng dung dịch nước chứa khoảng 40mg, 60mg hoặc 80mg sắt được hòa tan trong 15ml dung dịch.

Ngoài ra, đã bất ngờ phát hiện được rằng dược phẩm dạng lỏng chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat theo sáng chế có sự giảm độ nhớt đáng kể so với các dược phẩm theo giải pháp đã biết.

Dược phẩm dạng lỏng chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat theo sáng chế có độ nhớt thấp đáng kể so với các dược phẩm theo giải pháp đã biết có hàm lượng sắt tương đương. Có thể quan sát được sự giảm độ nhớt này trong dược phẩm chứa

hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat theo sáng chế thu được từ hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat với hàm lượng sắt bằng 5% và thậm chí thấy rõ ràng hơn khi so sánh các sản phẩm có hàm lượng sắt cao hơn, cụ thể là các sản phẩm có hàm lượng sắt lớn hơn hoặc bằng 6%, như quan sát được trong bảng 2. Tốt hơn, nếu độ nhớt của dược phẩm dạng lỏng chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat theo sáng chế với lượng khoảng 8% trọng lượng ở dạng đã hòa tan nhỏ hơn 400 mPa·s, tốt hơn nữa là nhỏ hơn 300 mPa·s.

Các đặc tính bất ngờ về độ tan cao của hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat theo sáng chế và độ nhớt thấp của các dược phẩm dạng lỏng chứa chúng là đặc biệt hữu ích cho việc điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat với nồng độ sắt cao (ví dụ, lớn hơn hoặc bằng 40mg trong 15ml dung dịch). Dung dịch được ưu tiên theo sáng chế chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat với lượng nằm trong khoảng từ 4 đến 15% trọng lượng, tốt hơn là từ 4,5 đến 12% trọng lượng, tốt hơn nữa là từ 5 đến 8% trọng lượng, so với tổng trọng lượng.

Đặc tính độ nhớt thấp này còn cho phép vi lọc các dược phẩm dạng lỏng chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat theo sáng chế.

Quá trình vi lọc này là đặc biệt hữu ích để bảo vệ các đặc tính của sản phẩm, dạng bào chế và việc bảo quản sản phẩm này sau đó. Việc tiến hành quá trình vi lọc và làm giảm mức độ nhiễm vi sinh vật cũng có thể làm giảm hoặc thậm chí tránh được việc sử dụng các chất bảo quản, ví dụ, các hợp chất paraben thường được sử dụng để ngăn ngừa sự tăng sinh của vi sinh vật.

Trên thực tế, quá trình vi lọc cho phép làm giảm đáng kể hàm lượng vi sinh vật của dược phẩm, tốt hơn nếu là các dược phẩm dạng lỏng chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat theo sáng chế.

Cho đến nay, độ nhớt cao của các dược phẩm dạng lỏng (ví dụ, dung dịch nước) chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat thu được từ casein trong chế độ ăn không được tinh chế thích hợp sẽ làm cản trở quá trình vi lọc này.

Quá trình vi lọc theo sáng chế có thể diễn ra trên các màng có cỡ lỗ được kiểm soát hoặc là quá trình lọc tiếp tuyến trên các màng có cỡ lỗ được kiểm soát để

làm giảm mức độ nhiễm vi sinh vật.

Quá trình vi lọc nêu trên có thể liên quan đến độ nhớt thấp của dược phẩm dạng lỏng (tốt hơn nếu là dung dịch nước) chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat, điều này là đặc biệt có lợi cho việc tạo ra các dược phẩm dạng lỏng có thời hạn sử dụng dài mà không cần sử dụng lượng lớn chất bảo quản.

Các ví dụ sau đây chỉ có mục đích minh họa một số phương án của sáng chế và các ví dụ này sẽ không được coi là làm giới hạn sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Ví dụ so sánh về việc điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat có hàm lượng sắt bằng khoảng 5% từ axit casein có bán trên thị trường.

Cho 600 ml nước đã làm mềm vào 50g axit casein trong chế độ ăn, hỗn hợp này được khuấy trong thời gian 30 phút và điều chỉnh đến độ pH ổn định bằng 8,4 bằng dung dịch chứa natri hydroxit 9,5% trong nước.

15g anhydrit sucxinic được cho thêm theo từng phần nhỏ trong khi vẫn khuấy. Trong khi cho thêm, độ pH được duy trì ở khoảng 8,4 bằng cách cho thêm dung dịch natri hydroclorua 9,5% theo thời gian. Dung dịch nước chứa axit clohydric 17% được thêm vào đến khi độ pH ổn định = 2,8. Tiến hành tách bằng cách lọc sucxinil casein đã kết tủa, chất này được tái tạo huyền phù trong 600ml nước đã làm mềm. Độ pH được điều chỉnh đến 8,5 bằng cách sử dụng dung dịch natri hydroxit 9,5%, dung dịch này được tiếp tục khuấy, phần chất không tan được lọc trên giấy lọc và dung dịch thu được bằng cách cho 14,1g sắt (III) clorua hexahydrat vào 119ml nước được cho thêm trong khi khuấy. Trong khi cho thêm, độ pH giảm đi và sắt (III) caseinsucxinylat kết tủa. Sau khi tiếp tục khuấy trong thời gian 30 phút, độ pH=2,9 và sản phẩm được lọc. Sản phẩm này được tạo huyền phù trong 600ml nước và dung dịch natri hydroxit 5% được cho thêm từ từ trong khi khuấy đến độ pH ổn định =8,5. Tiến hành ly tâm để loại bỏ thành phần không

tan bằng khoảng 20g sản phẩm ẩm; độ pH được điều chỉnh bằng cách sử dụng dung dịch axit clohydric 17% đến độ pH ổn định =2,8. Chất kết tủa được lọc và làm khô để thu được 54,1g sắt (III) caseinsucxinylat.

Ví dụ 2

Ví dụ so sánh về việc điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat có hàm lượng sắt bằng khoảng 6% từ axit casein có bán trên thị trường

Cho 600ml nước đã làm mềm vào 50g axit casein trong chế độ ăn, hỗn hợp này được khuấy trong thời gian 30 phút và điều chỉnh đến độ pH ổn định bằng 8,4 bằng dung dịch natri hydroxit 9,5% trong nước.

15g anhydrit sucxinic được cho thêm theo từng phần nhỏ trong khi vẫn khuấy. Trong khi cho thêm, độ pH được duy trì ở khoảng 8,4 bằng cách cho thêm dung dịch natri hydroclorua 9,5% theo thời gian. Dung dịch nước chứa axit clohydric 17% được thêm vào đến khi độ pH ổn định =2,8. Tiến hành tách bằng cách lọc sucxinil casein đã kết tủa, chất này được tái tạo huyền phù trong 600ml nước đã làm mềm. Điều chỉnh độ pH đến mức 8,5 bằng cách sử dụng dung dịch natri hydroxit 9,5%, hỗn hợp này được tiếp tục khuấy, phần chất không tan được lọc trên giấy lọc và dung dịch thu được bằng cách cho 17g sắt (III) clorua hexahydrat vào 150ml nước được thêm vào trong khi khuấy. Trong khi cho thêm dung dịch sắt (III) clorua, duy trì độ pH trong khoảng từ 6,0 đến 6,5 đồng thời cho thêm dung dịch natri hydroxit 5% trong nước. Sau khi cho thêm xong, dung dịch sắt (III) clorua, độ pH được điều chỉnh đến mức 2,8 bằng cách sử dụng dung dịch axit clohydric 17%. Huyền phù tạo thành được tiếp tục khuấy trong 30 phút và sản phẩm được lọc. Sản phẩm này được tạo huyền phù trong 600ml nước và dung dịch natri hydroxit 5% được cho thêm từ từ vào trong khi khuấy đến khi độ pH ổn định =8,5. Tiến hành ly tâm để loại bỏ thành phần không tan bằng khoảng 25g sản phẩm ẩm; điều chỉnh độ pH bằng cách sử dụng dung dịch axit clohydric 17% trong nước đến độ pH ổn định = 2,8. Chất kết tủa được lọc và làm khô để thu được 53,5g sắt (III) caseinsucxinylat.

Ví dụ 3

Ví dụ so sánh về việc điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat có hàm lượng sắt bằng khoảng 5% từ presamic casein có bán trên thị trường.

Theo phương pháp đã mô tả trong Ví dụ 1, sắt (III) caseinsucxinylat được điều chế từ 50g presamic casein trong chế độ ăn. Sau khi làm khô, thu được 54,2g sắt (III) caseinsucxinylat.

Ví dụ 4

Tinh chế axit casein có bán trên thị trường.

Cho 6 lít nước đã làm mềm vào 180g axit casein trong chế độ ăn, độ pH được điều chỉnh đến mức 7,0 bằng dung dịch natri hydroxit 1M trong nước. Hỗn hợp này được làm lạnh đến nhiệt độ 4°C, độ pH được làm giảm đến mức 4,5 bằng dung dịch axit clohydric 1M trong nước. Huyền phù tạo thành được tiếp tục khuấy trong thời gian 16 giờ và chất rắn được lọc trên bộ lọc Buchner.

Sản phẩm ướt được tạo huyền phù trong 6 lít nước đã làm mềm, độ pH được điều chỉnh đến mức 7,0 bằng dung dịch natri hydroxit 1M trong nước. Hỗn hợp này được làm lạnh đến nhiệt độ 4°C, độ pH được điều chỉnh đến mức 4,5 bằng dung dịch axit clohydric 1M trong nước. Huyền phù tạo thành được tiếp tục khuấy trong thời gian 3 giờ và chất rắn được lọc trên bộ lọc Buchner.

Sản phẩm ướt được tái tạo huyền phù trong 3 lít nước đã làm mềm, độ pH được điều chỉnh đến mức 7,0 bằng dung dịch natri hydroxit 1M trong nước. Hỗn hợp này được làm lạnh đến nhiệt độ 4°C, độ pH được điều chỉnh đến mức 4,5 bằng dung dịch axit clohydric 1M trong nước. Huyền phù tạo thành được tiếp tục khuấy trong thời gian 3 giờ và 390g sản phẩm ẩm được lọc trên bộ lọc Buchner, sản phẩm này được làm khô trong thiết bị làm khô kiểu quay trong thời gian 20 giờ ở nhiệt độ 25°C và áp suất 30mmHg (4kPa) để thu được 146g casein tinh khiết.

Ví dụ 5

Tinh chế axit casein có bán trên thị trường

Cho 6 lít nước đã làm mềm vào 18g axit casein trong chế độ ăn, độ pH được

điều chỉnh đến mức 7,0 bằng dung dịch natri hydroxit 1M trong nước. Hỗn hợp này được làm lạnh đến nhiệt độ 4°C, độ pH được điều chỉnh đến mức 4,5 bằng dung dịch axit clohydric 1M trong nước. Huyền phù tạo thành được tiếp tục khuấy trong 16 giờ và chất rắn được lọc trên bộ lọc Buchner.

408g sản phẩm ẩm được làm khô trong thiết bị làm khô kiểu quay trong thời gian 20 giờ ở nhiệt độ 25°C và 30 mmHg (4kPa) để thu được 162g casein tinh khiết.

Ví dụ 6

Tinh chế axit casein có bán trên thị trường

Cho 42 lít nước đã làm mềm vào 144g axit casein trong chế độ ăn. Độ pH được điều chỉnh đến mức ổn định =7,0 bằng dung dịch natri hydroxit 8% trong nước. Độ pH được điều chỉnh đến mức 3,0 bằng dung dịch axit clohydric 0,5M. Hỗn hợp này được làm lạnh đến nhiệt độ 2°C và độ pH được điều chỉnh đến mức 4,0 bằng dung dịch natri hydroxit 0,01M. Huyền phù tạo thành được tiếp tục khuấy trong thời gian một giờ và 318g sản phẩm ẩm được lọc trên bộ lọc Buchner, sản phẩm này được làm khô trong thiết bị làm khô kiểu quay trong thời gian 20 giờ ở nhiệt độ 25°C và 30 mmHg (4kPa) để thu được 126g casein tinh khiết.

Ví dụ 7

Tinh chế presamic casein có bán trên thị trường

Cho 6 lít nước đã làm mềm vào 180g presamic casein trong chế độ ăn, hỗn hợp này được khuấy trong thời gian 30 phút, làm lạnh đến nhiệt độ 4°C, hỗn hợp tạo thành được tiếp tục khuấy trong thời gian 16 giờ, độ pH được điều chỉnh đến mức 4,5 bằng dung dịch axit clohydric 1M trong nước. Huyền phù tạo thành được tiếp tục khuấy trong một giờ và chất rắn được lọc trên bộ lọc Buchner.

Sản phẩm ẩm được tạo huyền phù trong 6 lít nước đã làm mềm, độ pH được điều chỉnh đến mức 7,0 bằng dung dịch natri hydroxit 1M trong nước. Hỗn hợp này được làm lạnh đến nhiệt độ 4°C, độ pH được điều chỉnh đến mức 4,5 bằng dung dịch axit clohydric 1M trong nước. Huyền phù tạo thành được tiếp tục khuấy trong

thời gian 3 giờ và chất rắn được lọc trên bộ lọc Buchner.

Sản phẩm ẩm được tái tạo huyền phù trong 6 lít nước đã làm mềm, độ pH được điều chỉnh đến mức 7,0 bằng dung dịch natri hydroxit 1M trong nước. Hỗn hợp này được làm lạnh đến nhiệt độ 4°C, độ pH được điều chỉnh đến mức 4,5 bằng dung dịch axit clohydric 1M trong nước. Huyền phù tạo thành được tiếp tục khuấy trong thời gian 16 giờ và chất rắn được lọc trên bộ lọc Buchner.

290g sản phẩm ẩm được làm khô trong thiết bị làm khô kiểu quay trong thời gian 20 giờ ở nhiệt độ 25°C và 30 mmHg (4kPa) để thu được 126g casein tinh khiết.

Ví dụ 8

Điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat có hàm lượng sắt bằng khoảng 5% từ casein tinh chế được trong các Ví dụ 4, 5, 6 và 7.

Theo phương pháp đã mô tả trong Ví dụ 1, hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat được điều chế từ casein tinh khiết như được mô tả trong các Ví dụ 4, 5, 6 và 7.

Bảng dưới đây thể hiện lượng liên quan đến mỗi chế phẩm.

Bảng 3

Sắt (III) caseinsucxinylat	Nguyên liệu	Lượng casein đã sử dụng	Lượng sắt (III) caseinsucxinylat thu được
Ví dụ 8A	Axit casein tinh chế được trong Ví dụ 4	50g	54,6g
Ví dụ 8B	Axit casein tinh chế được trong Ví dụ 5	50g	55,2g
Ví dụ 8C	Axit casein tinh chế được trong Ví dụ 6	50g	54,3g

Ví dụ 8D	Presamic casein tinh chế được trong Ví dụ 7	50g	52,7g

Ví dụ 9

Điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat có hàm lượng sắt bằng khoảng 6% từ các casein tinh chế được trong các Ví dụ 4 và 7.

Theo phương pháp đã mô tả trong Ví dụ 2, hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat được điều chế từ casein tinh chế được như được mô tả trong các Ví dụ 4 và 7.

Bảng dưới đây thể hiện lượng liên quan đến mỗi chế phẩm.

Bảng 4

Sắt (III) caseinsucxinylat	Nguyên liệu	Lượng casein đã sử dụng	Lượng sắt (III) caseinsucxinylat thu được
Ví dụ 9A	Axit casein tinh chế được trong Ví dụ 4	50g	56,0g
Ví dụ 9B	Presamic casein tinh chế được trong Ví dụ 7	50g	52,5g

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat, khác biệt ở chỗ, hợp chất này có hàm lượng sắt nằm trong khoảng từ 4,5 đến 7% trọng lượng, độ tan lớn hơn khoảng 92% và có tỷ lệ trọng lượng của phospho/nitơ lớn hơn 5%, tốt hơn là lớn hơn khoảng 5,5%.

2. Hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, hợp chất này chứa hàm lượng tạp chất protein nhỏ hơn khoảng 15% trọng lượng, tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 10% trọng lượng.

3. Phương pháp điều chế hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat theo điểm 1 hoặc 2 bao gồm các bước sau:

   a. cho casein và anhydrit sucxinic phản ứng trong nước để thu được casein sucxinyl hóa,

   b. cho casein sucxinyl hóa phản ứng với sắt (III) clorua để thu được hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat,

   khác biệt ở chỗ, casein trong bước a) nêu trên là casein đã tinh chế, có hàm lượng tạp chất protein nhỏ hơn 15% trọng lượng và/hoặc hàm lượng các tạp chất vô cơ nhỏ hơn 1% trọng lượng và/hoặc tỷ lệ phospho/nitơ lớn hơn 5%.

4. Phương pháp theo điểm 3, khác biệt ở chỗ, hàm lượng tạp chất protein nêu trên nhỏ hơn khoảng 10% trọng lượng và/hoặc hàm lượng các tạp chất vô cơ nêu trên nhỏ hơn khoảng 0,4% trọng lượng.

5. Phương pháp theo điểm 3, khác biệt ở chỗ, các tạp chất protein nêu trên là các protein không thuộc nhóm bao gồm alpha-S1 casein, alpha-S2 casein, beta casein, kapa casein, giả-kapa casein.

6. Phương pháp theo điểm 3, khác biệt ở chỗ, casein đã tinh chế nêu trên có tỷ lệ trọng lượng của phospho/nitơ lớn hơn khoảng 5%.

7. Phương pháp theo điểm 3, khác biệt ở chỗ, casein đã tinh chế nêu trên thu được từ axit casein hoặc presamic casein.

8. Phương pháp theo điểm 3, khác biệt ở chỗ, phương pháp này còn bao gồm bước bổ sung là vi lọc dung dịch nước chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat.

9. Dược phẩm chứa hợp chất sắt caseinsucxinylat theo điểm 1 hoặc 2 và ít nhất một tá dược chấp nhận được về mặt dược lý.

10. Dược phẩm theo điểm 9, khác biệt ở chỗ, dược phẩm này ở dạng lỏng hoặc dạng rắn, tốt hơn là ở dạng lỏng.

11. Dược phẩm theo điểm 10, khác biệt ở chỗ, dạng lỏng này là dung dịch hoặc hỗn dịch, tốt hơn là dung dịch nước.

12. Dược phẩm theo điểm 9, khác biệt ở chỗ, dược phẩm này là dung dịch chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat với lượng khoảng 8% trọng lượng và có độ nhớt nhỏ hơn khoảng 400 mPa·s, tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 300 mPa·s.

13. Dược phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 12, trong đó dược phẩm này chứa hợp chất sắt (III) caseinsucxinylat với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 15% trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6 đến 12% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 7 đến 9% trọng lượng, so với tổng trọng lượng của dược phẩm này.