



(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)



1-0025284

(51)⁷ C07H 17/07; A23L 1/30; A61K 36/18

(13) B

(21) 1-2015-01262

(22) 22/10/2012

(86) PCT/JP2012/006758 22/10/2012

(87) WO2014/064731 01/05/2014

(45) 25/08/2020 389

(43) 27/07/2015 328A

(73) ALPS PHARMACEUTICALS, IND. CO., LTD. (JP)

10-50, Mukaimachi 2-chome, Furukawa-cho, Hida-shi, Gifu, 5094241, Japan

(72) MINAMI, Kazunobu (JP); TANIWAKI, Shinji (JP); KATSUMATA, Akiko (JP).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHẦN CHIẾT GIÀU RUTIN VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PHẦN CHIẾT NÀY

(57) Sáng chế đề cập tới phương pháp sản xuất phần chiết giàu rutin từ thực vật và phần chiết giàu rutin của *Uncaria elliptica* thu được bằng phương pháp này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới phân chiết giàu rutin và phương pháp sản xuất phân chiết này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Rutin là flavonoit tự nhiên được dùng làm nguyên liệu sản xuất Troxerutin, là chất có tác dụng làm tăng độ bền mao mạch và làm giảm tính thấm của thành tĩnh mạch. Nghiên cứu lâm sàng cho thấy rằng các bệnh nhân đã được điều trị bằng dẫn xuất rutin, Venoruton, có khả năng cải thiện được hội chứng sau nghẽn mạch. Xem, Panminerva Medicine, 53, trang 13, 2011. Nghiên cứu khác chỉ ra rằng rutin là một trong các chất chống nghẽn mạch hiệu quả nhất. Xem, The Journal of Clinical Investigation, 122, No 6, 2012. Rutin được dùng làm nguyên liệu ban đầu để sản xuất nhiều dược chất và ngày càng có vai trò quan trọng hơn.

Để chiết và tinh chế rutin từ các nguồn thực vật khác nhau, ví dụ, cây hòe (*Sophora Japonica*) (Châu Á), *Fava d'anta* (Bra-xin), và *Uncaria elliptica* (Bra-xin), các dung môi nước và metanol thường được sử dụng. Tuy nhiên, trên thực tế, phân chiết giàu rutin thu được từ các nguồn thực vật này lại có nhiều nhược điểm đáng kể, như có màu nâu đậm và chứa hàm lượng sắt cao hơn so với các phân chiết giàu rutin từ các nguồn khác. Màu nâu này được coi là sắc tố có trong thực vật.

Rất khó để loại bỏ màu nâu này và làm giảm hàm lượng sắt bằng các phương pháp chiết và/hoặc tinh chế thông thường, do sắt thường liên kết chặt chẽ với các sắc tố. Đã có nhiều nỗ lực để khắc phục các nhược điểm này. Tuy nhiên, các nỗ lực này không làm giảm được lượng sắt liên kết trong các sắc tố mà vẫn duy trì được hiệu suất tạo rutin cao.

Cần có quy trình thích hợp, có hiệu quả kinh tế, có thể áp dụng ở quy mô lớn để sản xuất phân chiết giàu rutin với hàm lượng rutin cao, hàm lượng sắt thấp, và giảm được hàm lượng tạo sắc tố.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế dựa trên phát hiện bất ngờ ra dạng kết hợp đặc hiệu của rượu và axit có thể được sử dụng để xử lý thực vật nhằm thu được phần chiết giàu rutin có hàm lượng sắt và sắc tố thấp.

Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất phần chiết giàu rutin từ thực vật. Phương pháp này bao gồm các bước: hòa tan phần chiết thực vật chứa rutin vào metanol hoặc etanol để thu được phần chiết rutin thô, phần chiết thực vật chứa rutin rắn này chứa rutin với hàm lượng nằm trong khoảng từ 90% đến 95% khối lượng và sắt với hàm lượng nằm trong khoảng từ 100 đến 300 phần triệu; làm giảm thể tích của phần chiết rutin thô để thu được dịch cô đặc; điều chế hỗn hợp bằng cách bổ sung axit với nồng độ 1-15% khối lượng phần chiết thực vật chứa rutin vào dịch cô đặc này, và tùy ý rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon, nước, hoặc cả hai loại này, trong đó phần chiết thực vật chứa rutin chiếm từ 8% đến 30% (khối lượng/thể tích) hỗn hợp và axit được chọn từ nhóm bao gồm axit ascorbic, axit xitric, axit tartric, axit galic và axit malic; để yên hỗn hợp này để tạo ra kết tủa; và tách riêng kết tủa, từ đó thu được phần chiết giàu rutin chứa sắt với hàm lượng nhỏ hơn 20 phần triệu.

Phần chiết thực vật chứa rutin có thể được điều chế ở dạng kết tủa thô bằng cách chiết *Uncaria elliptica*, cây hòe (*Sophora Japonica*), hoặc *Fava d'anta* với nước, rượu, hoặc rượu trong nước.

Theo một số phương án, axit được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 10%, ví dụ, từ 1 đến 5%, hoặc từ 2 đến 4% khối lượng phần chiết thực vật chứa rutin. Trong trường hợp khi nước và rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon được bổ sung, thì tỷ lệ giữa nước và rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon có thể nằm trong khoảng từ 1:1 đến 5:1, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1:1 đến 3:1. Nước và rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon có thể được bổ sung riêng rẽ, đồng thời, hoặc ở dạng dung dịch rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon trong nước.

Sáng chế cũng đề cập đến phần chiết giàu rutin của *Uncaria elliptica*, phần chiết này chứa rutin với hàm lượng nằm trong khoảng từ 97% đến 99% như được xác định bởi HPLC và sắt với hàm lượng nhỏ hơn 20 phần triệu, độ hấp thụ của phần chiết này ở 550 nm nhỏ hơn 0,2. Phần chiết này còn có thể chứa nước với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 10% khối lượng. Nó có thể được điều chế bằng phương pháp nêu trên.

Mô tả chi tiết sáng chế

Việc mô tả chi tiết một hoặc nhiều phương án theo sáng chế được nêu trong phần mô tả dưới đây. Các dấu hiệu, mục đích và ưu điểm khác của sáng chế sẽ được nêu bởi phần mô tả và phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Sáng chế mô tả phương pháp thu được phần chiết giàu rutin từ các nguồn thực vật bằng cách sử dụng dạng kết hợp mới của rượu và axit. Phần chiết giàu rutin thu được bằng phương pháp này làm giảm đáng kể quá trình tạo sắc tố và hàm lượng sắt so với các phần chiết được điều chế bằng các phương pháp thông thường.

Bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, phần chiết chứa rutin rắn có thể được điều chế từ các nguồn thực vật khác nhau, ví dụ, cây hòe (*Sophora Japonica*) (Châu Á), *Fava d'anta* (Bra-xin), và *Uncaria elliptica* (Bra-xin). Các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ngâm, gia nhiệt, lắc, khuấy trộn, hoặc để ngấm nguyên liệu thực vật, ví dụ, thân và lá, trong các dung môi khác nhau. Nguyên liệu thực vật được sử dụng có thể ở dạng toàn bộ thực vật khô, thực vật đã nghiền hoặc bột. Các dung môi bao gồm nước, rượu (ví dụ, metanol), hoặc rượu trong nước. Sau khi chiết, dung dịch phần chiết có thể được tách riêng ra khỏi chất rắn bằng cách sàng, lọc, ép hoặc các kỹ thuật thích hợp khác. Dịch lọc có thể được cô đặc và làm nguội để tạo ra kết tủa, từ đó thu được phần chiết chứa rutin rắn. Để mô tả các phương pháp chiết khác nhau, xem, ví dụ, Patent Trung quốc 1013579; US2006/0099690; và Dighe et al., International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2(1):750-757 (2011).

Thông thường, phần chiết chứa rutin rắn được điều chế bằng các phương pháp này có hàm lượng sắt cao, ví dụ, từ 100 đến 300 phần triệu, và tạo sắc tố đậm, ví dụ, sắc tố vàng hoặc màu nâu, đặc biệt là các phần chiết có nguồn gốc từ *Uncaria elliptica*. Rutin có thể có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 85% đến 90% khối lượng của các phần chiết chứa rutin rắn này.

Do đó, phần chiết chứa rutin rắn đã điều chế có thể được hòa tan trong dung môi rượu, tốt hơn là metanol hoặc etanol, để thu được dung dịch phần chiết rutin thô. Ví dụ, phần chiết rắn với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 – 0,13g có thể được hòa tan vào 1ml dung môi. Dung dịch phần chiết thô có thể được cô đặc tiếp, ví dụ, dưới áp suất không

khí, để làm giảm thể tích của nó, ví dụ, từ 4 đến 10 lần. Thể tích cuối cùng của dung dịch phân chiết thô có thể được xác định trước dựa vào thể tích và hàm lượng mong muốn của hỗn hợp sẽ được nêu dưới đây.

Axit, và tùy ý rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon, ví dụ, metanol, etanol, propanol, hoặc n-butanol, được bổ sung vào phân chiết rutin thô nêu trên để thu được hỗn hợp. Nước cũng có thể được chứa trong hỗn hợp.

Axit đã sử dụng được chọn từ axit ascorbic, axit xitric, axit tartric, axit galic, và axit malic. Axit được bổ sung vào phân chiết rutin thô với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 15%, ví dụ, từ 1 đến 10%, hoặc từ 1 đến 5% khối lượng phân chiết chứa rutin rắn nêu trên đã dùng để điều chế phân chiết rutin thô.

Hỗn hợp cần chứa ít nhất một rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon. Ví dụ, như đã nêu trên, metanol hoặc etanol (tức là, rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon) có thể được sử dụng để tạo ra dung dịch phân chiết rutin thô từ phân chiết chứa rutin rắn. Có thể không nhất thiết phải bổ sung rượu khác có 1 đến 4 nguyên tử cacbon vào phân chiết rutin thô. Trong một số trường hợp, để thu được hỗn hợp chứa phân chiết chứa rutin rắn với lượng nằm trong khoảng từ 8% đến 30% (khối lượng/thể tích), rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon, rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon trong nước, hoặc rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon và nước có thể được bổ sung, ví dụ, với lượng phân chiết chứa rutin rắn gấp từ 2 đến 12 lần (thể tích/khối lượng). Rượu khác có 1 đến 4 nguyên tử cacbon đã bổ sung có thể là giống hoặc khác với rượu đã dùng để tạo ra phân chiết rutin thô.

Rutin tồn tại ở các dạng hydrat khác nhau, như monohydrat, dihydrat, và trihydrat. Đã biết rằng dạng anhydrat và monohydrat là không ổn định. Do đó, tốt hơn là điều chế dihydrat hoặc trihydrat tương đối ổn định bằng cách hydrat hóa với nước trong quá trình tinh chế. Do đó, nước có thể được bổ sung vào dung dịch phân chiết rutin thô. Nước có thể được bổ sung riêng rẽ. Nước cũng có thể được bổ sung ở dạng dung dịch rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon trong nước. Tỷ lệ giữa nước và rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon có thể nằm trong khoảng từ 1:1 đến 5:1, ví dụ, nằm trong khoảng từ 1:1 đến 3:1. Như đã nêu trên, tốt hơn nếu hỗn hợp cuối cùng chứa phân chiết chứa rutin rắn với lượng nằm trong khoảng từ 8% đến 30% (khối lượng/thể tích).

Hỗn hợp chứa dung dịch phân chiết rutin thô, rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon, axit, và tùy ý nước, tiếp đó được để yên để kết tủa, ví dụ, tạo ra tinh thể. Ví dụ, hỗn hợp

có thể được cô đặc tiếp, và hỗn hợp đã cô đặc này được khuấy trộn và để lạnh để tạo ra kết tủa. Kết tủa này có thể được thu gom bằng kỹ thuật thích hợp bất kỳ, ví dụ, lọc, được rửa bằng rượu và/hoặc nước, và được làm khô.

Phần kết tủa, tức là phần chiết giàu rutin, có thể chứa rutin với hàm lượng nằm trong khoảng từ 97% đến 99% như được xác định bởi HPLC, và sắt với hàm lượng nhỏ hơn 20 phần triệu, tức là, nhỏ hơn 10 phần triệu. Nó cũng có chứa sắc tố với lượng thấp, ví dụ, độ hấp thụ của phần chiết ở 550 nm nhỏ hơn 0,2. Nó cũng có thể chứa nước với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 10% khối lượng. Phần chiết giàu rutin có thể có kích cỡ hạt bất kỳ, ví dụ, bằng 5 μm hoặc nhỏ hơn. Ví dụ, nó có thể chứa các hạt cỡ nano.

Phần chiết giàu rutin được điều chế bằng phương pháp nêu trên là hữu ích để dùng với các mục đích khác nhau. Nó có thể được bào chế ở dạng dược phẩm, ví dụ, thuốc. Nó cũng có thể được sử dụng làm thực phẩm bổ sung dinh dưỡng hoặc chất phụ gia thực phẩm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ cụ thể dưới đây được đưa ra nhằm mục đích minh họa, chứ không giới hạn phần còn lại của bản mô tả theo cách bất kỳ. Nếu không có chỉ dẫn cụ thể nào khác, tin rằng khi dựa vào phần mô tả này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể sử dụng sáng chế ở phạm vi rộng nhất của nó. Toàn bộ các đơn công bố nêu trong phần mô tả này được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Các trị số của hàm lượng sắt, độ tinh khiết và độ hấp thụ được mô tả trong các Ví dụ 1-4 dưới đây thu được bằng các quy trình sau:

(1) Hàm lượng sắt

1,0g mẫu được lấy chính xác và được sulfat hóa. 2ml axit clohydric được bổ sung vào phần cặn. Tiếp đó, mẫu được làm khô và gia nhiệt trong nước sôi sau khi bổ sung 10ml nước với một giọt axit clohydric. Sau khi để nguội, thể tích này được điều chỉnh chính xác đến 10,0ml và tiếp đó được lọc qua máy lọc cỡ 0,45 micron. Nồng độ của sắt trong dung dịch mẫu được xác định bằng cách phân tích ICP.

(2) Độ hấp thụ khả kiến

1,0g mẫu được hòa tan trong 15ml dimethylformamit (DMF). Sau khi điều chỉnh

thể tích đến 20,0ml bằng DMF, dung dịch được lọc qua máy lọc cỡ 0,45 micron. Độ hấp thụ của mẫu đã lọc được đo ở 550 nm với độ dài lan truyền là 1,0 cm.

(3) Phân tích HPLC

Phân tích HPLC được thực hiện theo tài liệu chuyên khảo châu Âu (EP monograph) về Rutoxit trihydrat, các chất liên quan bằng sắc ký lỏng. Nói một cách ngắn gọn, các chất phản ứng và các điều kiện sử dụng được nêu dưới đây:

Dung dịch thử nghiệm: Hòa tan 0,10g chất cần thử nghiệm trong 20ml metanol và pha loãng thành 100,0ml bằng pha động B.

Dung dịch so sánh (a): Hòa tan 10,0 mg rutoxit trihydrat CRS trong 10,0ml metanol.

Dung dịch so sánh (b): Pha loãng 1,0ml dung dịch so sánh (a) đến 50,0ml bằng pha động B.

Cột (LiChrospher 100 RP-8, C8, 4,0 x 250 mm, Agilent):

- kích cỡ: $l = 0,25$ m, đường kính trong = 4,0 mm,
- pha ổn định: octylsilyl silicagel dùng cho sắc ký (5 μ m)
- nhiệt độ: 30°C

Pha động:

- pha động A: trộn 5 thể tích tetrahydrofuran với 95 thể tích dung dịch natri dihydrogen phosphat 15,6 g/l được điều chỉnh tới độ pH = 3,0 bằng axit phosphoric.
- pha động B: trộn 40 thể tích tetrahydrofuran với 60 thể tích dung dịch natri dihydrogen phosphat 15,6 g/l được điều chỉnh tới độ pH = 3,0 bằng axit phosphoric.

Thời gian biểu về gradien

Thời gian (phút)	Pha động A (%)	Pha động B (%)
0 - 10	50 - 0	50 - 100
10 - 20	0	100
20 - 21	0 - 50	100 - 50

21 - 25

50

50

Tốc độ chảy: 1 ml/phút.

Phát hiện: quang phổ kế ở 280 nm.

Thể tích tiêm: 20 µl.

Các axit và rượu sử dụng trong các Ví dụ 1-4 dưới đây là do Wako Pure Chemical Industries, Ltd (Osaka) cung cấp: axit ascorbic (loại thứ nhất tối thiểu bằng 99,5%); axit xitric (loại đặc biệt tối thiểu bằng 98,0 %); axit malic (loại đặc biệt tối thiểu bằng 99,0%); axit galic (loại thứ nhất 98,0 - 103,0%); axit tartric (loại thứ nhất tối thiểu bằng 99,0%); metanol (mức thứ nhất tối thiểu bằng 99,5%); etanol (loại đặc biệt tối thiểu bằng 99,5 %); n-propanol (loại đặc biệt tối thiểu bằng 99,7%); n-butanol (loại đặc biệt tối thiểu bằng 99,0 %).

Ví dụ 1: Điều chế phần chiết rutin thô

Thân và lá của *Uncaria eliptica* được chiết bằng nước và/hoặc rượu bằng cách sử dụng các quy trình thông thường để thu được phần chiết chứa rutin rắn. Ba bộ phần chiết chứa rutin rắn (mỗi bộ 50g) này được hòa tan trong 600ml metanol và được khuấy trong hai giờ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 30 đến 35°C. Mỗi dung dịch được lọc và cô đặc dưới áp suất không khí để thu được 300ml phần chiết rutin thô.

Do đó, phần chiết chứa rutin rắn chứa rutin với lượng nằm trong khoảng từ 85 đến 90% (khối lượng/khối lượng) và sắt với lượng nằm trong khoảng từ 100 đến 200 phần triệu. Nó chuyển sang màu nâu sẫm khi được hòa tan trong các dung môi hữu cơ và độ hấp thụ trung bình trong DMF ở 550 nm bằng 0,8 đến 1,3. Dữ liệu được tóm tắt trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1

Số lô	Sắt (phần triệu)	Độ hấp thụ (550 nm)	Hàm lượng rutin (%), khối lượng/khối lượng	Hàm lượng nước (%)
A	167	1,173	88,0	9,6
B	174	1,149	89,2	9,2

C	160	1,048	88,6	8,9
---	-----	-------	------	-----

Ví dụ 2: Ảnh hưởng của axit ascorbic khi kết hợp với các dung môi khác nhau

(1) Metanol

Ba bộ dung dịch phần chiết rutin thô, mỗi bộ thu được bằng cách hòa tan 50g phần chiết chứa rutin rắn trong 600ml metanol (MeOH), được cô đặc dưới áp suất không khí để thu được 300ml thể tích. Mỗi phần cô đặc được nhận 0, 1,0, hoặc 5,0g axit ascorbic và mỗi phần này được cô đặc tiếp để thu được 150ml thể tích. Sau khi để kết tinh bằng cách làm lạnh, tinh thể rutin tinh khiết được thu gom bằng cách lọc, tiếp đó rửa bằng metanol. Rutin tinh khiết được làm khô ở nhiệt độ 60°C trong 5 giờ, và được phân tích như đã nêu trên. Các kết quả được tổng hợp trong Bảng 2 dưới đây. Việc bổ sung axit ascorbic trong quá trình kết tinh sẽ làm giảm lượng sắt dư và giảm độ hấp thụ ở 550 nm theo cách phụ thuộc liều.

Bảng 2

STT	Chiết	Kết tinh	Axit	Lượng (%) [*]	Sắt (phần triệu)	Độ hấp thụ (550 nm)	Diện tích rutin HPLC (%)	Hiệu suất (%)	Hàm lượng nước (%)
	MeOH	MeOH	Không dùng	-	22,4	0,235	99,0	70,2	4,9
	MeOH	MeOH	Axit ascorbic	2	13,7	0,146	98,9	69,9	4,7
	MeOH	MeOH	Axit ascorbic	10	10,2	0,114	98,4	70,5	5,5

^{*}Lượng bổ sung tương ứng với khối lượng của phần chiết chứa rutin rắn

(2) Etanol

Hai bộ phần chiết rutin thô có dung tích 500 ml, thu được bằng cách hòa tan 25g phần chiết chứa rutin rắn trong etanol (EtOH), mỗi dung dịch được cô đặc dưới áp suất không khí để thu được 100ml thể tích. Mỗi phần cô đặc được nhận 25ml nước chứa axit ascorbic với lượng bằng 0 hoặc 0,5g. Sau khi để kết tinh bằng cách khuấy trộn và làm lạnh, tinh thể rutin tinh khiết được thu gom bằng cách lọc, tiếp đó được rửa bằng 15ml

etanol 95%. Rutin tinh khiết được làm khô ở nhiệt độ 60°C trong 5 giờ và được phân tích như đã nêu trên. Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 3 dưới đây. Ảnh hưởng của axit ascorbic là không đáng kể trong trường hợp khi metanol được sử dụng trong quá trình kết tinh (xem ở trên).

Bảng 3

TT	Chiết	Kết tinh	Axit	Lượng (%) [*]	Sắt (phần triệu)	Độ hấp thụ (550 nm)	Diện tích rutin HPLC (%)	Hiệu suất (%)	Hàm lượng nước (%)
	EtOH	Nước/EtOH	Không dùng	-	10,7	0,280	97,1	84,0	9,2
	EtOH	Nước/EtOH	Axit ascorbic	2	9,59	0,260	97,0	83,5	8,7

^{*}Lượng bổ sung tương đương với khối lượng của phần chiết chứa rutin rắn

(3) Propanol

Hai bộ dung dịch phần chiết rutin thô được điều chế bằng cách hòa tan 25g phần chiết chứa rutin rắn trong 300ml MeOH. Mỗi phần chiết này được cô đặc dưới áp suất không khí để thu được 43ml thể tích. Mỗi phần cô đặc được nhận propanol trong nước (n-propanol : nước = 1 : 1; tổng thể tích là 200 ml) chứa axit ascorbic với lượng bằng 0 hoặc 0,5g. Sau khi để kết tinh bằng cách khuấy trộn và làm lạnh, tinh thể rutin tinh khiết được thu gom bằng cách lọc. Tinh thể rutin được rửa bằng 25ml n-propanol, tiếp đó rửa bằng nước. Rutin tinh khiết được làm khô ở nhiệt độ 80°C trong 6 giờ và được phân tích. Các kết quả phân tích được tóm tắt trong Bảng 4 dưới đây. Axit ascorbic làm giảm lượng sắt dư và làm giảm độ hấp thụ ở 550 nm của rutin tinh khiết.

Bảng 4

TT	Chiết	Kết tinh	Axit	Lượng (%) [*]	Sắt (phần triệu)	Độ hấp thụ (550 nm)	Diện tích rutin HPLC (%)	Hiệu suất (%)	Hàm lượng nước (%)
----	-------	----------	------	------------------------	------------------	---------------------	--------------------------	---------------	--------------------

MeOH	Nước/propanol	Không dùng	-	26,7	0,296	98,2	76,4	8,1
MeOH	Nước/propanol	Axit ascorbic	2	12,8	0,148	98,2	74,8	8,1

*Lượng bổ sung tương đương với khối lượng của phần chiết chứa rutin rắn

(4) Butanol

Mỗi dung dịch trong số bốn phần chiết rutin thô được điều chế bằng hòa tan 25g phần chiết chứa rutin rắn trong 300ml MeOH. Mỗi dung dịch phần chiết được cô đặc dưới áp suất không khí để thu được 43ml thể tích. Mỗi phần cô đặc được nhận n-butanol trong nước (nước: n-butanol = 133 : 67 ml) chứa 0, 0,25, 0,5, hoặc 2,5g axit ascorbic. Sau khi để kết tinh bằng cách khuấy trộn và làm lạnh, tinh thể rutin tinh khiết được thu gom bằng cách lọc, và tiếp đó được rửa bằng 25ml n-butanol, tiếp đó rửa bằng 100ml nước. Rutin tinh khiết được làm khô ở nhiệt độ 80°C trong 6 giờ và được phân tích như đã nêu trên. Các kết quả phân tích được tóm tắt trong Bảng 5. Axit ascorbic làm giảm lượng sắt dư và làm giảm độ hấp thụ ở 550 nm của rutin tinh khiết.

Bảng 5

TT	Chiết	Kết tinh	Axit	Lượng (%) [*]	Sắt (phần triệu)	Độ hấp thụ (550 nm)	Diện tích rutin HPLC (%)	Hiệu suất (%)	Hàm lượng nước (%)
5	MeOH	Nước/BuOH	Không dùng	-	60,3	0,701	97,6	83,6	8,4
6	MeOH	Nước/BuOH	Axit ascorbic	1	15,5	0,245	98,2	83,5	8,0
7	MeOH	Nước/BuOH	Axit ascorbic	2	1,86	0,097	98,2	82,4	7,9
8	MeOH	Nước/BuOH	Axit ascorbic	10	1,36	0,074	98,1	82,9	8,0

*Lượng bổ sung tương đương với khối lượng của phần chiết chứa rutin rắn

Ví dụ 3: Ảnh hưởng của các loại axit khác nhau khi kết hợp với butanol trong nước

Mỗi dung dịch trong số bảy dung dịch phần chiết rutin thô được điều chế bằng cách hòa tan 25g phần chiết chứa rutin rắn, thu được như được mô tả trong Ví dụ 1, trong 300ml MeOH. Các phần chiết được cô đặc dưới áp suất không khí để thu được mỗi dung dịch có thể tích 43 ml. Mỗi phần cô đặc nhận butanol trong nước (nước: n-butanol = 133 : 67 ml) chứa axit tartric, axit xitric, axit malic, hoặc axit galic với lượng được thể hiện trong Bảng 6 dưới đây.

Sau khi để kết tinh dạng cô đặc bằng cách khuấy trộn và làm lạnh, tinh thể rutin tinh khiết được thu gom bằng cách lọc. Rutin tinh khiết được rửa bằng 25ml n-butanol, tiếp đó bằng 100ml nước. Rutin tinh khiết được làm khô ở nhiệt độ 80°C trong 6 giờ và được phân tích như đã nêu trên. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 6. Ngoại trừ axit galic, tất cả các axit khác đều làm giảm lượng sắt dư và làm giảm độ hấp thụ ở 550 nm của rutin tinh khiết.

Các kết quả được mô tả trong các Ví dụ 2 và 3 cho thấy rằng việc kết hợp butanol với axit ascorbic có tác dụng làm giảm hàm lượng sắt và độ hấp thụ của sắc tố vàng ở 550 nm một cách hữu hiệu nhất.

Bảng 6

TT	Chiết	Kết tinh	Axit	Lượng (%) [*]	Sắt (phần triệu)	Độ hấp thụ (550 nm)	Diện tích rutin HPLC (%)	Hiệu suất (%)	Hàm lượng nước (%)
0	MeOH	Nước/BuOH	Không dùng	-	60,3	0,701	97,6	83,4	8,4
	MeOH	Nước/BuOH	Axit tartric	2	15,2	0,224	98,0	83,5	8,3
	MeOH	Nước/BuOH	Axit xitric	2	27,6	0,313	98,1	80,8	8,0
1	MeOH	Nước/BuOH	Axit malic	2	27,9	0,353	98,2	82,8	8,0
	MeOH	Nước/BuOH	Axit galic	2	60,6	0,809	98,0	82,9	8,0

2									
3	MeOH	Nước/BuOH	Axit tarttric	10	10,8	0,101	97,4	81,2	7,2
4	MeOH	Nước/BuOH	Axit tarttric Axit xitric Axit galic	3% mỗi dung dịch	18,6	0,146	97,3	81,0	7,3

*Lượng bổ sung tương đương với khối lượng của phần chiết chứa rutin rắn

Ví dụ 4: Ảnh hưởng của các dung môi

Rutin tinh khiết thu được bằng cách sử dụng các dung môi khác nhau không phải axit bất kỳ. Nhận thấy rằng butanol trong nước và etanol trong nước có tác dụng cải thiện hiệu suất của rutin tốt hơn so với các dung môi khác. Xem Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7

TT	Chiết	Kết tinh	Axit	Lượng (%) [*]	Sắt (phần triệu)	Độ hấp thụ (550 nm)	Diện tích rutin HPLC (%)	Hiệu suất (%)	Hàm lượng nước (%)
5	MeOH	MeOH	Không dùng	-	22,4	0,235	99,0	70,2	4,9
	EtOH	Nước/EtOH	Không dùng	-	10,7	0,280	97,1	84,0	9,2
	MeOH	Nước/propanol	Không dùng	-	26,7	0,296	98,2	76,4	8,1
	MeOH	Nước/BuOH	Không dùng	-	60,3	0,701	97,6	83,6	8,4

CÁC PHƯƠNG ÁN KHÁC

Toàn bộ các dấu hiệu được bộc lộ trong phần mô tả này có thể được kết hợp theo các cách kết hợp bất kỳ. Mỗi dấu hiệu đã bộc lộ trong phần mô tả này có thể được thay bằng một dấu hiệu khác với mục đích giống nhau, tương đương hoặc tương tự. Do đó, nếu không có chỉ dẫn cụ thể nào khác, mỗi dấu hiệu đã bộc lộ chỉ nhằm mục đích minh họa cho nhiều dấu hiệu chung tương đương hoặc tương tự.

Từ phần mô tả nêu trên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng xác định được các đặc tính chủ yếu của sáng chế, và không nằm ngoài phạm vi và bản chất của sáng chế, có thể tạo ra các biến đổi và cải biến khác nhau theo sáng chế sao cho phù hợp với các ứng dụng và điều kiện khác nhau. Do đó, các phương án khác cũng nằm trong phạm vi của các phần yêu cầu bảo hộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất phần chiết giàu rutin từ thực vật, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

hòa tan phần chiết thực vật chứa rutin vào metanol hoặc etanol để thu được dịch chiết rutin thô, phần chiết thực vật chứa rutin này chứa rutin với hàm lượng nằm trong khoảng từ 90% đến 95% khối lượng và sắt với hàm lượng nằm trong khoảng từ 100 đến 300 phần triệu;

làm giảm thể tích của dịch chiết rutin thô để thu được phần cô đặc;

điều chế hỗn hợp bằng cách bổ sung vào phần cô đặc này axit với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 15% khối lượng phần chiết thực vật chứa rutin, rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon và nước, trong đó phần chiết thực vật chứa rutin có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 8% đến 30% (khối lượng/thể tích) hỗn hợp này và axit là axit ascorbic.

để yên hỗn hợp này để tạo ra kết tủa; và

tách riêng kết tủa này, từ đó thu được phần chiết giàu rutin chứa sắt với hàm lượng nhỏ hơn 20 phần triệu.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phần chiết thực vật chứa rutin được điều chế ở dạng kết tủa thô bằng cách chiết *Uncaria elliptica*, cây hòe (*Sophora Japonica*), hoặc *Fava d'anta* với nước, rượu hoặc rượu trong nước.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó axit được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 10% khối lượng phần chiết thực vật chứa rutin, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2% đến 4% phần chiết thực vật chứa rutin.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon và nước được bổ sung ở dạng dung dịch rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon trong nước chứa nước với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 80% thể tích.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tỷ lệ thể tích giữa nước và rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon nằm trong khoảng từ 1:1 đến 5:1 hoặc nằm trong khoảng từ 1:1 đến 3:1.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon là metanol và axit là axit ascorbic.
7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon là n-butanol hoặc propanol.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon là n-butanol.
9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó axit được bổ sung với lượng nằm trong khoảng từ 1% đến 10% khối lượng phần chiết thực vật chứa rutin, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1% đến 5% khối lượng phần chiết thực vật chứa rutin, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2% đến 4% khối lượng phần chiết thực vật chứa rutin.
10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó tỷ lệ thể tích giữa nước và rượu có 1 đến 4 nguyên tử cacbon nằm trong khoảng từ 1:1 đến 5:1 hoặc nằm trong khoảng từ 1:1 đến 3:1.
11. Phần chiết giàu rutin của *Uncaria elliptica* thu được bằng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó phần chiết này chứa rutin với hàm lượng nằm trong khoảng từ 97% đến 99% như được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) và sắt với hàm lượng nhỏ hơn 20 phần triệu, độ hấp thụ của phần chiết này ở 550 nm là nhỏ hơn 0,2, trong đó độ hấp thụ được đo theo phương pháp sau: 1,0g mẫu được hòa tan trong 15ml dimethylformamit, sau đó thể tích này được điều chỉnh tới 20,0ml bằng dimethylformamit, dung dịch này được lọc qua bộ lọc cỡ 0,45 μ m và độ hấp thụ của mẫu đã lọc được đo ở 550nm với độ dài lan truyền là 1,0 cm.
12. Phần chiết giàu rutin theo điểm 11, trong đó phần chiết này chứa rutin với hàm lượng ít nhất bằng 98% như được xác định bởi HPLC và sắt với hàm lượng nhỏ hơn 10 phần triệu, độ hấp thụ ở 550 nm nhỏ hơn 0,1.
13. Phần chiết giàu rutin theo điểm 12, trong đó phần chiết này chứa nước với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 10% khối lượng.