



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11) 
2-0001813

(51)⁷ **A61K 31/365, 36/28, C07D 493/00**

(13) **Y**

(21) 2-2015-00049

(22) 25.02.2015

(45) 25.09.2018 366

(43) 25.05.2015 326

(73) **PHÒNG THÍ NGHIỆM TRỌNG ĐIỂM CÔNG NGHỆ LỘC, HÓA DẦU (VN)**
Số 2, Phạm Ngũ Lão, quận Hoàn Kiếm, thành phố Hà Nội

(72) **Vũ Thị Thu Hà (VN), Trần Thị Thanh Thủy (VN), Lê Thị Hồng Ngân (VN), Trần Văn Hiếu (VN), Nguyễn Văn Chúc (VN)**

(54) **QUY TRÌNH PHÂN LẬP TAGITININ C TỪ LÁ CÚC QUỖ (TITHONIA
DIVERSIFOLIA)**

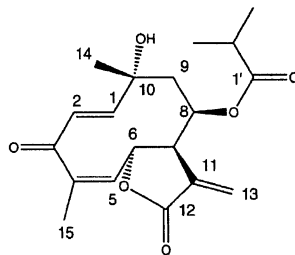
(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp phân lập tagitinin C từ lá cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*) bao gồm các bước: chiết xuất nhanh lá cúc quỳ bằng etyl axetat để tạo dịch chiết giàu sesquiterpen lacton, lọc và loại bỏ tạp chất không phân cực bằng cách chiết phân lớp với n-hexan rồi tách loại dung môi, sau đó tinh chế tagitinin C trên sắc ký cột.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình hiệu quả để phân lập tagitinin C từ lá cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*). Cụ thể là, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình phân lập tagitinin C từ lá cúc quỳ sử dụng phương pháp chiết nhanh bằng etyl axetat cho phép giảm lượng hóa chất cần dùng, tiết kiệm thời gian phân lập đồng thời giảm thiểu khả năng gây ô nhiễm môi trường.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Tagitinin C là một sesquiterpen lacton thuộc khung germanocranolid, là hoạt chất chính có mặt trong các loài thực vật thuộc chi *Tithonia*, họ Cúc (Asteriaceae).



Hình 1. Công thức cấu tạo hợp chất tagitinin C

Tagitinin C có hoạt tính kháng ký sinh trùng sốt rét đáng chú ý với cả chủng nhạy cloroquin và chủng kháng cloroquin. Bên cạnh đó, tagitinin C còn có hoạt tính gây độc tế bào với nhiều dòng ung thư cũng như hoạt tính kháng sinh trưởng, gây chết theo chương trình đối với dòng tế bào ung thư gan Hep-G2. Ngoài ra hợp chất này còn thể hiện hoạt tính kháng u nguyên bào ở người.

Các phương pháp phân lập tagitinin C có thể được chia thành hai nhóm sau là chiết nhanh và chiết chậm.

Phương pháp chiết chậm (ngâm chiết) sử dụng dung môi phân cực như metanol, hỗn hợp metanol – nước hoặc etanol, hỗn hợp etanol – nước. Một số tác giả sử dụng phương pháp này để phân lập tagitinin C như: Yutaka Sashida, Yoshihiro Mimaki, Minpei Kuroda, Ryosuke Kobayashi, Hiroaki Kando, Kosuke Nosaka, Hiroyasu Ishii, Takao Yamori, “Compound and Pharmaceutical composition”, US. Pat. No. 7563913 B2, 2009; May-Hua Liao, Yuan-Nuan Tsai, Chi-Yu Yang, Chi-Long Juang, Ming-Yi Lee, Li-Hsueh Chang, Hsiao-Chuan Wen, “Anti-human hepatoma Hep-G2 proliferative, apoptotic, and antimutagenic activity of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* leaves”, *J Nat Med* (2013) 67:98–106. Phương pháp này có ưu điểm là bên cạnh tagitinin C, còn thu được nhiều hoạt chất khác do các dung môi này chiết xuất hầu hết các hợp chất hữu cơ phân tử lượng thấp có mặt trong nguyên liệu. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp này là hiệu suất tinh chế không cao do cần phải tiến hành nhiều bước khác nhau để tinh chế tagitinin C từ dịch chiết chứa rất nhiều hoạt chất.

Phương pháp chiết nhanh sử dụng dung môi diclometan: Đây là phương pháp được một số tác giả áp dụng như: S. R. Ambrosio, Y. Oki, V. C. G. Heleno, J. S. Chaves, P. G. B. D. Nascimento, J. E. Lichston, M. G. Constantino, E. M. Varanda, F. B. Da Costa, “Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity”, *Phytochemistry* 2008, 69, 2052; Abraham García và Guillermo Delgado, “Constituents from *Tithonia diversifolia*. Stereochemical Revision of 2 α -Hydroxytirotonin”, *J. Mex. Chem. Soc.* 2006, 50(4), 180-183. Do các sesquiterpen lacton trong đó có tagitinin C thường tập trung ở tuyến lông ngay trên bề mặt lá cúc quỳ nên phương pháp này chiết xuất tập trung vào lớp chất sesquiterpen lacton. Do vậy ưu điểm của phương pháp này là giúp cho quá trình tinh chế tagitinin C đơn giản hơn. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp là đòi hỏi lượng lớn dung môi diclometan tương đối độc hại.

Tài liệu “Hsiang-Ru Lin, *Sesquiterpene lactones from Tithonia diversifolia act as peroxisome proliferator-activated receptor agonists*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22 (2012) 2954–2958” đề cập đến quy trình phân lập tagitinin C từ cây cúc quỳ bao gồm bước chiết nguyên liệu trong dung môi hexan, etyl axetat và etanol riêng rẽ.

Các tài liệu “Trần Thị Thanh Thủy và các đồng tác giả, *Kết quả ban đầu về thành phần hoá học cao chiết diclometan lá cúc quỳ (Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray)*, Tạp chí Hoá học 1.51(6)770-773” và “E. Ziémons et al., *Supercritical carbon dioxide extraction of tagitinin C from Tithonia diversifolia*, J. of Supercritical Fluids 33 (2005) 53–59” đề cập đến quy trình phân lập tagitinin C từ cây cúc quỳ bao gồm bước chiết nguyên liệu trong dung môi diclometan.

Tài liệu “Maria A. F. M. Miranda et al., *Phytotoxins from Tithonia diversifolia*, Journal of Natural Products” đề cập đến quy trình phân lập tagitinin C từ cây cúc quỳ bao gồm bước chiết nguyên liệu trong dung môi etyl axetat.

Cho đến nay, chưa có tài liệu nào công bố phương pháp phân lập tagitinin C trong đó sử dụng quá trình chiết nhanh bằng etyl axetat là dung môi có hoạt tính cao, ít độc hại, có khả năng phân hủy sinh học cao. Hơn nữa, do nhiệt độ sôi của etyl axetat cao hơn rất nhiều so với diclometan nên giảm thất thoát do bay hơi trong quá trình sử dụng, giảm phát thải ô nhiễm môi trường. Vì vậy, việc sử dụng etyl axetat làm dung môi phân lập tagitinin C có thể được ứng dụng trong công nghiệp thay thế các loại dung môi khác.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là đề xuất phương pháp phân lập tagitinin C từ lá cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*) bằng etyl axetat nhằm tăng hiệu quả và giảm thiểu ô nhiễm môi trường, cho phép thu tagitinin C có độ tinh khiết cao.

Để đạt được mục đích nêu trên, giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp phân lập tagitinin C từ lá cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*) bao gồm các bước:

- Chiết nhanh lá cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*) bằng dung môi etyl axetat để thu được dịch chiết;
- Phân lớp dịch chiết này lần lượt bằng n-hexan và etyl axetat nhằm loại bỏ các tạp chất không phân cực trong phân lớp n-hexan;
- Dịch chiết etyl axetat giàu hoạt chất tagitinin C được cô đuổi dung môi trong điều kiện chân không nhằm thu cặn chiết etyl axetat;
- Tiến hành tinh chế cặn chiết etyl axetat bằng sắc ký cột silica gel để thu tagitinin C tinh khiết.

Do thời gian tiếp xúc với nguyên liệu không quá dài, dung môi etyl axetat có khả năng hòa tan tagitinin C mà không kéo theo quá nhiều các tạp chất khác, dẫn đến hiệu suất tinh chế tagitinin C được cải thiện đáng kể, giúp tiết kiệm dung môi và thời gian tinh chế. Phương pháp này không yêu cầu sử dụng dung môi diclometan độc hại và dễ bay hơi nên có thể thực hiện ở quy mô công nghiệp.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Thuật ngữ “chiết nhanh” được sử dụng trong giải pháp hữu ích này là quá trình chiết xuất các hoạt chất trong nguyên liệu thực vật ra khỏi nguyên liệu bằng dung môi với thời gian tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi rất ngắn từ 2-5 phút.

Thuật ngữ “chiết chậm” được sử dụng trong giải pháp hữu ích này có nghĩa này là quá trình trích ly các hoạt chất trong nguyên liệu thực vật ra khỏi nguyên liệu bằng dung môi với thời gian tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi tương đối dài từ 2-5 ngày.

Thuật ngữ “sắc ký cột silica gel” được sử dụng trong giải pháp hữu ích này có nghĩa là phương pháp phân tách lý – hóa trong đó các chất được tách ra khỏi hỗn hợp dựa trên sự phân bố liên tục của chúng giữa hai pha: pha tĩnh là chất nhồi silica

gel có ái lực khác nhau với các chất khác nhau trong hỗn hợp; pha động dịch chuyển qua pha tĩnh theo một phương nhất định.

Thuật ngữ “hệ dung môi rửa giải” được sử dụng trong giải pháp hữu ích này có nghĩa là một hỗn hợp dung môi có tỷ lệ nhất định, đóng vai trò pha động dùng để rửa giải các chất bị hấp phụ trên silica gel trong quá trình phân tách sắc ký.

Thuật ngữ “nguyên liệu” được sử dụng trong giải pháp hữu ích này có nghĩa là lá cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*) được thu hoạch khi cây trưởng thành, ra hoa, được sấy khô và nghiền nhỏ đến kích thước thích hợp.

Thuật ngữ “dịch chiết” được sử dụng trong giải pháp hữu ích này có nghĩa là dung dịch gồm dung môi và các chất hữu cơ có mặt trong nguyên liệu lá cúc quỳ *Tithonia diversifolia* có thể tan trong dung môi trong quá trình chiết xuất.

Tagitinin C tinh khiết được phân lập theo phương pháp bao gồm:

- Chiết nhanh nguyên liệu bằng dung môi etyl axetat để tạo ra dịch chiết;
- Phân lớp dịch chiết này lần lượt bằng n-hexan và etyl axetat nhằm loại bỏ các tạp chất không phân cực trong phân lớp n-hexan;
- Dịch chiết etyl axetat giàu hoạt chất tagitinin C được cô đuổi dung môi trong điều kiện chân không nhằm thu cặn chiết etyl axetat;
- Tiến hành tinh chế cặn chiết etyl axetat bằng sắc ký cột silica gel để thu được tagitinin C tinh khiết.

Lá cúc quỳ được sấy khô, nghiền nhỏ đến kích thước nằm trong khoảng từ 50 đến 1000 μm , tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100 đến 500 μm , tốt nhất là ở kích thước 200 – 300 μm . Các hoạt chất sesquiterpen lacton chủ yếu tập trung ở tuyến lông trên bề mặt lá. Kích thước nguyên liệu từ 50 – 1000 μm đảm bảo các tuyến lông không bị phá vỡ và giúp dung môi có thể tiếp xúc tốt nhất với nguyên

liệu. Nguyên liệu được chiết nhanh ở điều kiện nhiệt độ và áp suất môi trường bằng dung môi etyl axetat. Tốt hơn, nếu lượng nguyên liệu được chiết nhanh bằng dung môi etyl axetat với lượng nằm trong khoảng từ 3-10 lít dung môi/kg nguyên liệu, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 4-8 lít dung môi/kg nguyên liệu, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 5-6 lít dung môi/kg nguyên liệu, với tỷ lệ này đảm bảo chiết xuất được tối đa các hợp chất sesquiterpen lacton trong nguyên liệu và tiết kiệm dung môi. Thời gian tiếp xúc giữa nguyên liệu với dung môi nằm trong khoảng từ 2- 15 phút, tốt hơn là 2 – 10 phút, tốt nhất là 2- 5 phút. Nếu thời gian tiếp xúc ngắn hơn 2 phút thì không hòa tan hết các hợp chất sesquiterpen lacton, nếu thời gian tiếp xúc dài hơn 15 phút, ngoài các hợp chất sesquiterpen lacton, dung môi sẽ hòa tan thêm các hợp chất khác làm giảm hoạt tính cao chiết.

Tiếp tục thực hiện quy trình chiết 2 – 5 lần, tốt nhất là chiết 3 lần, các thí nghiệm cho thấy sau 3 lần chiết, cao chiết giảm hoạt tính do hàm lượng sesquiterpen lacton trong nguyên liệu giảm, nếu tiếp tục chiết, dung môi hòa tan các hợp chất không có hoạt tính từ nguyên liệu. Dịch thu được của các lần chiết được gộp chung, sau đó được tách loại dung môi.

Tiến hành phân tách dịch chiết thu được trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là n-hexan/etyl axetat 7 : 3. Kiểm tra sự có mặt của tagitinin C trong các phân đoạn thu được trên sắc ký bản mỏng. Tiếp tục tinh chế phân đoạn chứa tagitinin C trên sắc ký cột nhờ silica gel với hệ dung môi rửa giải là n-hexan/etyl axetat 6 : 4 để thu được tagitinin C sạch.

Tiếp theo, tagitinin C sạch được rửa nhanh bằng dietyl ete lạnh hai lần, sau đó, sấy khô để thu được tagitinin C tinh khiết.

Tagitinin C tinh khiết thu được ở trên được đóng gói, dán nhãn.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích sẽ được hiểu một cách rõ hơn từ ví dụ dưới đây. Ví dụ này chỉ có tính chất minh họa nhưng không làm giới hạn phạm vi bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1:

Chuẩn bị 1 kg nguyên liệu cúc quỳ đã nghiền nhỏ đến kích thước 200 – 300 μm

+ Chiết lần 1: Tiến hành chiết nguyên liệu cúc quỳ bằng 5 L etyl axetat với thời gian tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi 2 h, thu được 2,8 L dịch chiết.

+ Chiết lần 2: Dùng 5 L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 1, sau đó tiếp tục chiết xuất 2 h, sau đó lọc dịch chiết, thu được 4,4 L dịch chiết.

+ Chiết lần 3: Dùng 5 L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 2, tiếp tục chiết xuất 2 h, sau đó lọc dịch chiết, thu được 4,5 L dịch chiết.

+ Chiết lần 4: Dùng 5 L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 3, tiếp tục chiết xuất 2 h, sau đó lọc dịch chiết, thu được 4,4 L dịch chiết.

Gộp dịch chiết của cả 4 lần chiết và tách loại etyl axetat, thu được cao chiết tổng etyl axetat $CQ_1 = 69,4 \text{ g}$ (cao chiết tổng etyl axetat)

Tiến hành chiết phân lớp để loại tạp chất

Hòa tan cao chiết tổng etyl axetat trong 50 ml MeOH/H₂O tỉ lệ 7 : 3 chiết bằng n-hexan (3 lần chiết /300ml) cho vào phễu tách lấy phần tan trong n-hexan, sau đó quay cất thu hồi dung môi n-hexan.

Phần không tan trong n-hexan cho vào chiết lại bằng EtOAc (3 lần chiết /300ml) thu được phân đoạn etyl axetat CQ_{1E} có khối lượng 35,8g (dịch cao etyl axetat).

Tiến hành tinh chế đối với dịch chiết nhanh bằng etyl axetat có ký hiệu là CQ_{1E} = 35,8 g trên hệ sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là n-hexan/etyl axetat 7 : 3, thu được 9 phân đoạn, ký hiệu lần lượt là CQ_{1E1}, CQ_{1E2}, CQ_{1E3}, CQ_{1E4}, CQ_{1E5}, CQ_{1E6}, CQ_{1E7}, CQ_{1E8}, CQ_{1E9}.

Tinh chế phân đoạn CQ_{1E4} trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là n-hexan/etyl axetat tỷ lệ 6 : 4 thu được 205 mg Tagittinin C đạt độ tinh khiết 90,6%.

Ví dụ 2:

Chuẩn bị 1 kg nguyên liệu cúc quỳ đã nghiền nhỏ đến kích thước 200 – 300 μ m

+ Chiết lần 1: Tiến hành chiết nguyên liệu cúc quỳ bằng 5 L etyl axetat với thời gian tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi 1 phút, thu được 2,1 L dịch chiết.

+ Chiết lần 2: Dùng 5 L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 1, tiếp tục chiết xuất 1 phút, sau đó lọc dịch chiết, thu được 4,1L dịch chiết.

+ Chiết lần 3: Dùng 5 L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 2, tiếp tục chiết xuất 2 h, sau đó lọc dịch chiết, thu được 4,4 L dịch chiết.

+ Chiết lần 4: Dùng 5 L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 3, tiếp tục chiết xuất 2 h, sau đó lọc dịch chiết, thu được 4,5 L dịch chiết.

Gộp dịch chiết của cả 4 lần chiết và tách loại etyl axetat, thu được cao chiết etyl axetat tổng CQ₂ = 38,1 g (cao chiết tổng etyl axetat)

Tiến hành chiết phân lớp để loại tạp chất

Hòa tan cao chiết tổng etyl axetat trong 50 ml MeOH/H₂O tỉ lệ 7 : 3 chiết bằng n-hexan (3 lần chiết /300ml) cho vào phễu tách lấy phần tan trong n-hexan, sau đó quay cất thu hồi dung môi n-hexan.

Phần không tan trong n-hexan cho vào chiết lại bằng EtOAc (3 lần chiết /300ml) thu được phân đoạn etyl axetat CQ₂E có khối lượng 18,8g (dịch cao etyl axetat).

Tiến hành tinh chế đối với dịch chiết nhanh bằng etyl axetat có ký hiệu là CQ₂E = 18,8 g trên hệ sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là n-hexan/etyl axetat 7 : 3, thu được 7 phân đoạn, ký hiệu lần lượt là CQ₂E₁, CQ₂E₂, CQ₂E₃, CQ₂E₄, CQ₂E₅, CQ₂E₆, CQ₂E₇.

Tinh chế phân đoạn CQ₂E₃ trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là n-hexan/etyl axetat tỷ lệ 6 : 4 thu được 168 mg Tagittinin C đạt độ tinh khiết 95,6%.

Ví dụ 3:

Chuẩn bị 1 kg nguyên liệu cúc quỳ đã nghiền nhỏ đến kích thước 200– 300 µm

+ Chiết lần 1: Tiến hành chiết nguyên liệu cúc quỳ bằng 10 L etyl axetat với thời gian tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi là 5 phút, thu được 4,3 L dịch chiết.

+ Chiết lần 2: Dùng 10L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 1, tiếp tục chiết xuất 5 phút, sau đó lọc dịch chiết, thu được 9,3 L dịch chiết.

+ Chiết lần 3: Dùng 5 L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 2, tiếp tục chiết xuất 5 phút, sau đó lọc dịch chiết, thu được 9,5 L dịch chiết.

+ Chiết lần 4: Dùng 5 L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 3, tiếp tục chiết xuất 5 phút, sau đó lọc dịch chiết, thu được 9,4 L dịch chiết.

Gộp dịch chiết của cả 4 lần chiết và tách loại etyl axetat thu được cao tổng etyl axetat CQ₃ = 49,2 g (cao chiết tổng etyl axetat)

Tiến hành chiết phân lớp để loại tạp chất

Hòa tan cao chiết tổng etyl axetat trong 50 ml MeOH/H₂O tỉ lệ 7 : 3 chiết bằng n-hexan (3 lần chiết /300ml) cho vào phễu tách lấy phần tan trong n-hexan, sau đó quay cất thu hồi dung môi n-hexan.

Phần không tan trong n-hexan cho vào chiết lại bằng EtOAc (3 lần chiết /300ml) thu được phân đoạn etyl axetat CQ₃E có khối lượng 24,6g (dịch cao Etyl axetat).

Tiến hành tinh chế đối với dịch chiết nhanh bằng etyl axetat có ký hiệu là CQ₃E = 24,6 g trên hệ sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là n-hexan/etyl axetat 7 : 3 thu được 7 phân đoạn ký hiệu lần lượt là CQ₃E₁, CQ₃E₂, CQ₃E₃, CQ₃E₄, CQ₃E₅, CQ₃E₆, CQ₃E₇.

Tinh chế phân đoạn CQ₃E₃ trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là n-hexan/etyl axetat tỷ lệ 6 : 4 thu được 205 mg Tagittinin C đạt độ tinh khiết 95,7%.

Ví dụ 4:

Chuẩn bị 1 kg nguyên liệu cúc quỳ đã nghiền nhỏ đến kích thước 200 – 300 μ m

+ Chiết lần 1: Tiến hành chiết nguyên liệu cúc quỳ với 3 L etyl axetat với thời gian tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi 2 h, thu được 1,3 L dịch chiết.

+ Chiết lần 2: Dùng 3 L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 1, tiếp tục chiết xuất 5 phút, sau đó lọc dịch chiết, thu được 2,4 L dịch chiết.

+ Chiết lần 3: Dùng 5 L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 2, tiếp tục chiết xuất 2 h, sau đó lọc dịch chiết, thu được 2,4 L dịch chiết.

+ Chiết lần 4: Dùng 5 L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 3, tiếp tục chiết xuất 2 h, sau đó lọc dịch chiết, thu được 2,5 L dịch chiết.

Gộp dịch chiết của cả 4 lần chiết và tách loại etyl axetat thu được cao tổng etyl axetat $CQ_4 = 36,7$ g (cao chiết tổng etyl axetat)

Tiến hành chiết phân lớp để loại tạp chất

Hòa tan cao chiết tổng etyl axetat trong 50 ml MeOH/H₂O tỉ lệ 7 : 3 chiết bằng n-hexan (3 lần chiết /300ml) cho vào phễu tách lấy phần tan trong n-hexan sau đó quay cất nhằm thu hồi dung môi n-hexan.

Phần không tan trong n-hexan cho vào chiết lại bằng EtOAC (3 lần chiết /300ml) thu được phân đoạn etyl axetat CQ_4E có khối lượng 18,1g (dịch cao etyl axetat).

Tiến hành tinh chế đối với dịch chiết nhanh bằng etyl axetat có ký hiệu là $CQ_4E = 36,8$ g trên hệ sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là n-hexan/etyl axetat 7 : 3 thu được 7 phân đoạn ký hiệu lần lượt là CQ_4E_1 , CQ_4E_2 , CQ_4E_3 , CQ_4E_4 , CQ_4E_5 , CQ_4E_6 , CQ_4E_7 .

Tinh chế phân đoạn CQ_4E_3 trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là n-hexan/etyl axetat tỷ lệ 6 : 4 thu được 159 mg Tagittinin C có độ tinh khiết 94,8%.

Ví dụ 5:

Chuẩn bị 1 kg mẫu nguyên liệu cúc quỳ đã nghiền nhỏ đến kích thước 200 – 300 μ m

+ Chiết lần 1: Tiến hành chiết nguyên liệu cúc quỳ bằng 5 L etyl axetat với thời gian tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi 5 phút, thu được 2,6 L dịch chiết.

+ Chiết lần 2: Dùng 5 L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 1, tiếp tục chiết xuất 5 phút, sau đó lọc dịch chiết, thu được 4,4 L dịch chiết.

+ Chiết lần 3: Dùng 5 L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 2, tiếp tục chiết xuất 5 phút, sau đó lọc dịch chiết, thu được 4,5 L dịch chiết.

+ Chiết lần 4: Dùng 5 L etyl axetat để ngâm bã chiết lần 3, tiếp tục chiết xuất 5 phút, sau đó lọc dịch chiết, thu được 4,4 L dịch chiết.

Gộp dịch chiết của cả 4 lần chiết và tách loại etyl axetat, thu được cao tổng etyl axetat $CQ_5 = 48,9$ g (cao chiết tổng etyl axetat)

Tiến hành chiết phân lớp để loại tạp chất

Hòa tan cao chiết tổng etyl axetat trong 50 ml MeOH/H₂O tỉ lệ 7 : 3 chiết bằng n-hexan (3 lần chiết /300ml) cho vào phễu tách lấy phần tan trong n-hexan sau đó quay cất nhằm thu hồi dung môi n-hexan.

Phần không tan trong n-hexan cho vào chiết lại với EtOAC (3 lần chiết /300ml) thu được phân đoạn etyl axetat CQ_5E có khối lượng 24,2g (dịch cao etyl axetat).

Tiến hành tinh chế đối với dịch chiết nhanh bằng etyl axetat có ký hiệu là $CQ_5E = 24,2$ g trên hệ sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là n-hexan/etyl axetat 7 : 3, thu được 7 phân đoạn ký hiệu lần lượt là CQ_5E_1 , CQ_5E_2 , CQ_5E_3 , CQ_5E_4 , CQ_5E_5 , CQ_5E_6 , CQ_5E_7 .

Tinh chế phân đoạn CQ_5E_3 trên sắc ký cột silica gel với hệ dung môi rửa giải là n-hexan/etyl axetat tỷ lệ 6 : 4, thu được 204 mg Tagittinin C có độ tinh khiết 95,8%.

Những lợi ích có thể đạt được

Qua các ví dụ được minh họa ở trên, cho thấy rằng phương pháp theo giải pháp hữu ích cho phép phân lập được tagitinin C tinh khiết với giá thành thấp do tiết kiệm được lượng dung môi cần phải sử dụng, giảm thiểu các chi phí liên quan đến việc xử lý dung môi đã qua sử dụng, giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phân lập tagitinin C từ lá cúc quỳ (*Tithonia diversifolia*), khác biệt ở chỗ, với mục đích phân tách nhanh tagitinin C, tiết kiệm dung môi và giảm ô nhiễm môi trường bằng cách sử dụng dung môi ít độc hại, phương pháp này bao gồm các bước:

- chiết nhanh nguyên liệu bằng dung môi etyl axetat để tạo ra dịch chiết;
- phân lớp dịch chiết này lần lượt bằng n-hexan và etyl axetat nhằm loại bỏ các tạp chất không phân cực trong phân lớp n-hexan;
- cô đặc dịch chiết etyl axetat giàu hoạt chất tagitinin C bằng cách cô đuổi dung môi trong điều kiện chân không nhằm thu được cặn chiết etyl axetat;
- tiến hành tinh chế cặn chiết etyl axetat bằng sắc ký cột silica gel để thu tagitinin C tinh khiết.

2. Phương pháp theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, nguyên liệu lá cúc quỳ được nghiền nhỏ đến kích thước 200 – 300 μm .

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2 trong đó bước chiết nhanh nguyên liệu bằng dung môi etyl axetat được thực hiện với tỷ lệ giữa dung môi và nguyên liệu là 5 – 6 L dung môi/kg nguyên liệu .