



(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)



2-0004017

(51) **A61K 36/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00046

(22) 02/02/2021

(45) 25/03/2025 444

(43) 25/08/2022 413A

(71) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội (VN)
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

(72) Phan Minh Giang (VN); Vũ Minh Trang (VN); Đỗ Thị Việt Hương (VN); Đỗ Thị Thảo (VN); Nguyễn Công Toại (VN); Nguyễn Khánh Hạ (VN).

(54) QUY TRÌNH CHIẾT VÀ TINH SẠCH EUPATORIOPICRIN TỪ NGUYÊN LIỆU
LÁ CÂY YÊN BẠCH NHẬT (EUPATORIUM JAPONICUM THUNB.)

(21) 2-2021-00046

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết và tinh sạch eupatoriopicrin từ nguyên liệu lá cây yên bạch Nhật (*Eupatorium japonicum* Thunb.) gồm các bước sau: chuẩn bị lá khô cây yên bạch Nhật đạt tiêu chuẩn nguyên liệu; xay lá khô thành bột mịn để tăng diện tích tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi chiết; ngâm chiết bột lá khô trong metanol ở nhiệt độ phòng, lọc thu dịch chiết metanol, bã lọc được ngâm chiết tiếp với metanol; các dịch chiết metanol được gộp lại cất loại metanol dưới áp suất giảm ở 50°C cho một phần chiết metanol, phần chiết này được hòa thêm nước cất và chiết lần lượt các chất theo độ phân cực giữa pha nước và dung môi hữu cơ có độ phân cực tăng dần *n*-hexan và diclometan loại bỏ chlorophyll, lipit, phytosterol, tecpenoit; dịch chiết nước được cho chạy qua cột sắc ký, loại bỏ đường, muối và các tạp chất tan trong nước với các hệ dung môi H₂O và MeOH-H₂O, sau đó thu nhận phân đoạn giàu eupatoriopicrin và cất loại dung môi dưới áp suất giảm; loại bỏ các axit phenolic, flavonoit và flavonoit glycozit bằng cách cho phân đoạn MeOH-H₂O phản ứng với dung dịch NaOH cho eupatoriopicrin thô; chiết eupatoriopicrin thô và tinh chế cột sắc ký thường (CC) với silica gel, rửa giải với hệ dung môi diclometan-axeton.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết và tinh sạch tác nhân chống ung thư eupatoriopicrin từ lá cây yên bạch Nhật (*Eupatorium japonicum* Thunb.) thuộc họ thực vật Cúc – Asteraceae phục vụ việc bào chế các thuốc điều trị một số bệnh ung thư như ung thư phổi, sarcoma xơ, ung thư gan, ung thư vú hoặc làm hoạt chất chuẩn hóa cho các chế phẩm chống ung thư từ lá cây yên bạch Nhật.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Bệnh ung thư xuất hiện ở tất cả các lứa tuổi và giới tính. Bệnh được đặc trưng bởi sự tăng sinh không có tổ chức và sự phát triển của các tế bào không bình thường ở trong một mô hoặc một cơ quan. Các tế bào không bình thường này có thể xâm lấn và phá hủy các mô bên cạnh và một vài có thể lan tràn bằng di căn. Bệnh ung thư hiện nay có xu hướng gia tăng ở Việt Nam, số ca mắc ung thư mới khoảng 165.000 người một năm, số ca tử vong là 115.000 bệnh nhân. Trong số các loại bệnh ung thư đáng chú ý là ung thư phổi chiếm tỷ lệ mắc và tử vong hàng đầu ở nam giới, tiếp đó là ung thư dạ dày, gan và đại trực tràng. Ở nữ giới lần lượt là các bệnh ung thư vú, dạ dày và phổi. Phần lớn người mắc bệnh ung thư phổi thường được phát hiện ở giai đoạn muộn, và tỷ lệ người mắc bệnh ung thư phổi hiện nay đã tăng lên khoảng 50% so với 20-25% trước kia.

Bệnh ung thư hiện có thể được điều trị bằng nhiều phương pháp khác nhau như phẫu thuật, tia xạ (xạ trị liệu), điều trị bằng hóa chất (hóa trị liệu), điều trị bằng miễn dịch... Trong số đó biện pháp hóa trị liệu sử dụng các thuốc chống ung thư

gây độc tế bào để tiêu diệt các tế bào ung thư.

Eupatorium japonicum Thunb. (tên tiếng Việt là yên bạch Nhật hoặc sơn lan) là cây thân cỏ, phân nhánh nhiều, thân và cành có lông đa bào. Lá mọc đối, hình mác thuôn nhọn, lá đơn nguyên, lá phía gốc thân thường xẻ 3 thùy sâu, kích thước $(8 - 10) \times (1,5 - 2,5)$, mép có răng cưa; 5 - 6 cặp gân phụ, có lông ở cả 2 mặt, thường tập trung nhiều ở gân, mặt dưới có tuyến hình hạt tròn màu vàng dày đặc; cuống lá dài 3 - 6 mm có lông đa bào, gốc lá nhọn. Cụm hoa đầu, hợp thành dạng ngù mọc ở đỉnh ngọn; cụm hoa đầu có cuống dài 1 - 4 mm, có lông và có 5 hoa. Hoa hình ống, lưỡng tính, 6 - 7 mm. Tổng bao gồm 7 - 12 lá bắc, xếp 2 - 3 hàng; hàng ngoài 1 - 2 mm, hàng trong 3 - 5 mm, đỉnh tù, mặt lưng phủ lông. Đế hoa phẳng. Ống tràng màu trắng, trắng tím hoặc trắng xanh, đỉnh có 5 thùy. Bao phấn có đỉnh tù, không có tai. Vòi nhụy dài hơn ống tràng, núm nhụy đầu nhọn không lông đầu vòi xẻ 2 thùy sâu, sát với vị trí xẻ thùy có lông dày đặc, gốc vòi nhụy có lông đa bào. Quả bế dài 2 - 3 mm, màu nâu đen, có 5 gờ dọc, có tuyến hạt màu vàng trên vỏ quả. Mào lông dài 3 - 4 mm, khoảng 28 - 42 lông, lông xù xì, đỉnh tù. Cây ra hoa và có quả tháng 6 - 12. Mọc ở các trảng cỏ, trên các vách núi đá, chân núi đá, ven rừng thưa, ở độ cao 100 - 1600 m. Phân bố ở các tỉnh Lai Châu, Lào Cai, Cao Bằng.

Eupatoriopicrin là một hợp chất sesquiterpen lacton và là một tác nhân chống ung thư mạnh trong các thử nghiệm với các dòng tế bào ung thư biểu mô phổi Lewis (*Lewis lung carcinoma*) và sarcoma xơ F10 26 (*F10 26 fibrosarcoma*) trong các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* trong các hệ u rắn ở chuột. Có rất ít tài liệu trên thế giới đề cập đến việc chiết, tách và tinh sạch eupatoriopicrin. Không có tài liệu nào đề cập đến việc tổng hợp hữu cơ hợp chất này do sự phức tạp về cấu trúc của nó do đó cho đến nay nguồn cung cấp chủ yếu eupatoriopicrin là chiết tách từ

cây *Eupatorium cannabinum*.

Tóm lại, chưa có sáng chế hoặc giải pháp hữu ích nào đề cập đến quy trình chiết và tinh sạch hoạt chất eupatoriopicrin từ nguyên liệu lá cây yên bạch Nhật (*Eupatorium japonicum* Thunb.) có độ tinh khiết cao và cũng chưa có sáng chế, giải pháp hữu ích nào đề cập việc chiết tách eupatoriopicrin từ dịch chiết nước là phần thải bỏ của các quy trình chiết với các dung môi hữu cơ.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết và tinh sạch eupatoriopicrin từ nguyên liệu lá cây yên bạch Nhật (*Eupatorium japonicum* Thunb.) bao gồm các bước sau:

- chuẩn bị lá khô cây yên bạch Nhật đạt tiêu chuẩn nguyên liệu;
- xay lá khô thành bột mịn để tăng diện tích tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi chiết;
- ngâm chiết bột lá khô trong metanol ở nhiệt độ phòng, lọc thu dịch chiết metanol, bã lọc được ngâm chiết tiếp với metanol;
- các dịch chiết metanol được gộp lại cất loại metanol dưới áp suất giảm ở 50°C cho một phần chiết metanol, phần chiết này được hòa thêm nước cất và chiết lần lượt các chất theo độ phân cực giữa pha nước và dung môi hữu cơ có độ phân cực tăng dần *n*-hexan và diclometan loại bỏ chlorophyll, lipit, phytosterol và tritecpenoit (amyrin và amylin axetat);
- dịch chiết nước được cho chạy qua cột sắc ký, loại bỏ đường, muối và các tạp chất tan trong nước với các hệ dung môi H₂O và MeOH-H₂O, sau đó thu nhận phân đoạn giàu eupatoriopicrin và cất loại dung môi dưới áp suất giảm;

- phân đoạn MeOH-H₂O chứa nhiều hợp chất phenolic và eupatoriopicrin được làm giàu trong phân đoạn này bằng cách loại bỏ các hợp chất axit phenolic và phenol glycozit qua phản ứng với dung dịch NaOH;
- eupatoriopicrin thô được tinh chế bằng cột sắc ký thường (CC) với silica gel, rửa giải với hệ dung môi diclometan-axeton.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chiết và tinh sạch eupatoriopicrin từ nguyên liệu lá cây yên bạch Nhật (*Eupatorium japonicum* Thunb.) bao gồm các bước sau:

- Chuẩn bị lá khô cây yên bạch Nhật đạt tiêu chuẩn nguyên liệu: lá tươi được rửa sạch, phơi khô trong không khí trong bóng râm, sau đó được sấy tiếp trong tủ sấy ở 45°C trong một ngày.
- Xay lá khô thành bột mịn để tăng diện tích tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi chiết nhằm tối ưu hiệu suất chiết các hợp chất hữu cơ có trong lá.
- Ngâm chiết bột lá khô (2 kg) trong metanol ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày, lọc thu dịch chiết metanol, bã lọc được ngâm chiết tiếp với metanol với qui trình được thực hiện 3 lần.
- Các dịch chiết metanol được gộp lại cất loại metanol dưới áp suất giảm ở 50 °C cho một phần chiết metanol, phần chiết này được hòa thêm nước cất và chiết lần lượt các chất theo độ phân cực giữa pha nước và dung môi hữu cơ có độ phân cực tăng dần *n*-hexan và diclometan.
- Dịch chiết nước được cho chạy qua cột sắc ký Diaion HP-20 (Mitsubishi, Nhật Bản) loại bỏ đường, muối và các tạp chất tan trong nước với các hệ dung môi H₂O, 20% và 40% MeOH-H₂O, sau đó thu nhận phân đoạn giàu eupatoriopicrin với 60% MeOH-H₂O và cất loại dung môi dưới áp suất giảm.

- Bước quyết định của quy trình tinh sạch là việc loại bỏ các loại bỏ các hợp chất axit phenolic và phenol glycozit có nhiều trong dịch nước bằng cách chuyển các hợp chất axit phenolic và phenol glycozit trong phân đoạn 60% MeOH-H₂O về dạng muối thông qua phản ứng với dung dịch NaOH 10%. Chiết eupatoriopocrin thô từ dịch nước bằng diclometan.
- Eupatoriopocrin thô được tinh chế cột sắc ký thường (CC) với silica gel (40-63 μ m), rửa giải với hệ dung môi diclometan-axeton 9:1 (v/v).

Kết tinh trong hệ dung môi chạy cột cho eupatoriopocrin (70 mg) dưới dạng tinh thể hình phiến không màu. Các phân đoạn chứa eupatoriopocrin khác có thể được gộp lại và kết tinh lại eupatoriopocrin trong hệ dung môi *n*-hexan-diclometan để tăng hiệu suất eupatoriopocrin.

Nguyên liệu thực vật là lá tươi cây yên bạch Nhật có thể được thu hái vào tháng 9 ở Sapa, Lào Cai.

Các dịch chiết metanol được gộp lại cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở 50 °C cho một phần chiết metanol; phần chiết này được hòa thêm nước cất và chiết phân bố loại bỏ các hợp chất ít phân cực bằng *n*-hexan (chiết 3 lần) và diclometan (chiết 3 lần). Các bước chiết đều thu hồi và quay vòng dung môi chiết (*n*-hexan và diclometan) do đó tiết kiệm dung môi và giảm thải chất hữu cơ ra môi trường.

Nguyên liệu cho sản xuất eupatoriopocrin là dịch chiết nước thường được loại bỏ sau khi chiết các hợp chất hữu cơ. Dịch chiết này đã được loại bỏ các tạp chất chlorophyll, lipid và các chất màu do đó dễ dàng tinh chế sạch eupatoriopocrin.

Bước điều chế phân đoạn giàu eupatoriopocrin này sử dụng các dung môi có giá thành thấp là MeOH và nước; có thể thu hồi MeOH bằng chưng cất phân đoạn. Cột Diaion có thể tái tạo lại và sử dụng nhiều lần.

Bước quyết định cho việc tinh sạch eupatoriopocrin là loại bỏ được các hợp chất axit phenolic và phenol glycozit có nhiều trong dịch nước. Việc này được thực hiện bằng phản ứng axit-bazơ của các hợp chất axit hoặc phenol có tính axit với

dung dịch NaOH, chuyển các muối nhận được vào dung dịch nước và chiết eupatoriopicrin thô từ dịch nước bằng diclometan. Nhờ bước này việc tinh sạch eupatoriopicrin đơn giản bằng tách cột sắc ký với một hệ dung môi.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập và tinh sạch eupatoriopicrin

- Xử lý nguyên liệu thực vật: lá yên bạch Nhật được tách khỏi cành, rửa sạch, phơi khô trong bóng râm, sấy trong tủ sấy một ngày ở nhiệt độ 45°C;
- Lá khô được xay thành bột mịn để tăng diện tích tiếp xúc giữa bột nguyên liệu và dung môi chiết nhằm tối ưu hiệu suất chiết các hợp chất hữu cơ từ lá;
- Bột lá khô (2 kg) được ngâm chiết trong metanol (10 lít) ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày. Dịch chiết metanol lần 1 được lọc khỏi phần bã, lặp lại qui trình ngâm chiết phần bã với metanol trong 3 ngày. Lọc dịch chiết metanol lần 2 và lặp lại qui trình ngâm chiết phần bã trong ba ngày để thu dịch chiết metanol lần 3;
- Các dịch chiết metanol qua 3 lần lọc được gộp lại và cất loại dung môi dưới áp suất giảm ở 50 °C cho một phần chiết metanol; phần chiết này được hòa loãng nước cất và chiết loại các thành phần ít phân cực vào pha *n*-hexan (chiết 3 lần × 0,5 lít) và sau đó với diclometan (3 lần × 0,5 lít). Thu hồi và quay vòng dung môi chiết sau mỗi lần chiết.
- Dịch chiết nước được cho chạy qua cột sắc ký Diaion HP-20 (Mitsubishi, Nhật Bản) loại bỏ đường, muối và các tạp chất tan trong nước với các hệ dung môi H₂O (2 lít), 20% và 40% MeOH-H₂O (lần lượt mỗi hệ dung môi 2 lít), sau đó thu nhận phân đoạn giàu eupatoriopicrin với 60% MeOH-H₂O (2 lít) và cất loại dung môi dưới áp suất giảm. Bước điều chế phân đoạn giàu eupatoriopicrin này sử dụng các dung môi có giá thành thấp là MeOH và nước; có thể thu hồi MeOH bằng chưng cất phân đoạn;

- Loại bỏ các loại bỏ các hợp chất phenol và phenol glycozit có nhiều trong phân đoạn 60% MeOH-H₂O (18 g) bằng cách thêm từ từ 0,5 - 1 lít dung dịch NaOH 10%. Thêm nước cất khi cần thiết đến 1 lít và chiết eupatoriopirin thô từ dịch nước bằng diclometan (3 lần $\times$ 0,5 lít).
- Eupatoriopirin thô (1 g) được hòa tan trong lượng MeOH vừa đủ tẩm với silica gel (40-63 μ m) sau đó đưa lên cột sắc ký thường (CC) nhồi ướt với silica gel (40-63 μ m) trong dung môi *n*-hexan. Cột sắc ký được rửa giải với hệ dung môi diclometan-axeton 9:1 (v/v) (500 ml). Kết tinh trong hệ dung môi chạy cột cho eupatoriopirin (70 mg) dưới dạng tinh thể hình phiến không màu. Có thể kết tinh lại eupatoriopirin trong hệ dung môi *n*-hexan-diclometan.
- Độ tinh khiết và nhận dạng eupatoriopirin được thực hiện với các phổ khối lượng (MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (¹H-NMR, ¹³C-NMR và DEPT).

Eupatoriopirin

Tinh thể hình phiến không màu.

ESI-MS (ion dương): m/z 363.4 (C₂₀H₂₆O₆).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.48 (3H, s, CH₃-14), 1.77 (3H, br s, CH₃-15), 2.10 (2H, m, H-3a), 2.23 (1H, m, H-2a), 2.34 (3H, m, H-2b, H-3b, H-9a), 2.86 (1H, dd, J = 5.5 Hz, 14.0 Hz, H-9b), 2.94 (1H, d, J = 4.0 Hz, H-7), 4.37 (2H, s, 2H-4'), 4.46 (2H, d, J = 5.5 Hz, 2H-5'), 4.78 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-5), 4.9 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-1), 5.15 (1H, t, J = 9.0 Hz, H-6), 5.59 (1H, br d, J = 3.0 Hz, H-13a), 5.82 (1H, br s, H-8), 6.29 (1H, d, J = 3.5 Hz, H-13b), 6.85 (1H, t, J = 6.0 Hz, H-3').

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 17.5 (C-15), 19.1 (C-14), 26.2 (C-2), 39.4 (C-3), 44.0 (C-9), 52.8 (C-7), 57.5 (C-4'), 59.3 (C-5'), 72.5 (C-8), 75.6 (C-6), 121.2 (C-13), 127.3 (C-5), 130.9 (C-1), 131.9 (C-2'), 133.9 (C-10), 136.6 (C-11), 142.6 (C-4), 143.9 (C-3'), 165.7 (C-1'), 169.6 (C-12).

Ví dụ 2: Thử nghiệm gây độc các dòng tế bào ung thư gan và ung thư vú người

Phương pháp thử độ độc tế bào ung thư *in vitro* được Viện Ung thư Quốc gia Hoa Kỳ (National Cancer Institute - NCI) xác nhận là phép thử độ độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro*. Phép thử này được thực hiện theo phương pháp của Skehan et al. (Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. (1990) New colorimetric cytotoxic assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82(13): 1107-1112). Phép thử tiến hành xác định hàm lượng protein tế bào tổng số dựa vào mật độ quang học (Optical Density - OD) đo được khi thành phần protein của tế bào được nhuộm bằng Sulforhodamine B (SRB). Giá trị OD máy đo được tỉ lệ thuận với lượng SRB gắn với phân tử protein, do đó lượng tế bào càng nhiều (lượng protein càng nhiều) thì giá trị OD càng lớn.

Phép thử được thực hiện trong điều kiện cụ thể như sau:

- Chất thử được pha thành các dải nồng độ thích hợp
- Trypsin hóa tế bào thí nghiệm để làm rời tế bào và đếm trong buồng đếm để điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm.
- Chất thử đã pha ở các nồng độ được đưa vào các giếng của đĩa 96 giếng, thêm tế bào đã điều chỉnh nồng độ phù hợp ở trên vào các giếng này sao cho nồng độ chất thử trong giếng là 100 µg/ml; 20 µg/ml; 4 µg/ml và 0,8 µg/ml.
- Ủ trong tủ ấm 48 giờ. Giếng không có chất thử nhưng có tế bào ung thư (180 µl) sẽ được sử dụng làm đối chứng ngày 0. Sau 1 giờ, giếng đối chứng ngày 0 tế bào sẽ được cố định bằng axit tricloacetic (TCA) 20%.
- Sau 48 giờ, tế bào được cố định bằng TCA trong 1 giờ, được nhuộm bằng SRB trong 30 phút ở 37 °C, rửa 3 lần bằng axit axetic rồi để khô ở nhiệt độ phòng.

- 10 mM Tris bazo (không đệm) để hòa tan lượng SRB, lắc nhẹ trong 10 phút.
- Đọc kết quả OD ở bước sóng 515-540 nm trên máy ELISA Plate Reader (Bio-Rad).
- Phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - \frac{[\text{OD (chất thử)} - \text{OD (ngày 0)}] \times 100}{\text{OD (đối chứng âm)} - \text{OD (ngày 0)}}$$

- Phép thử được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ 10 µg/ml; 2 µg/ml; 0,4 µg/ml; 0,08 µg/ml được sử dụng như là chất đối chứng dương.
- DMSO 10% luôn được sử dụng như đối chứng âm. Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm máy tính TableCurve 2Dv4.
- Theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI) chất tinh khiết được coi có hoạt tính tốt khi IC₅₀ ≤ 5 µM.

Kết quả thử nghiệm gây độc hai dòng tế bào ung thư gan người HepG2 (*human hepatocellular carcinoma*) và ung thư vú người MCF7 (*human breast carcinoma*) cho thấy eupatoriopicrin thể hiện hoạt tính mạnh trên các dòng tế bào ung thư với IC₅₀ 0,94 ± 0,12 µg/ml đối với dòng tế bào HepG2 và 1,22 ± 0,10 µg/ml đối với dòng tế bào MCF7.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến một phương pháp chiết eupatoriopicrin từ dịch

chiết nước thường được loại bỏ sau khi chiết các hợp chất hữu cơ. Việc loại bỏ được các hợp chất màu, chlorophyll và lipit và chiết được eupatoriopicrin vào dịch chiết nước; bước loại bỏ muối và đường đơn giản với cột tái tạo được Diaion làm cho qui trình tinh sạch hoạt chất này đơn giản do tránh được các tạp chất màu, tạp chất lipit, các tạp chất đường và muối.

Các bước chiết sử dụng các dung môi có giá thành thấp như metanol và nước, các dung môi chiết *n*-hexan và diclometan có thể quay vòng trong các bước chiết. Các hệ thống chiết và thu hồi dung môi cho các bước này đơn giản, thông dụng.

Bước tinh chế eupatoriopicrin sử dụng phản ứng axit-bazơ đơn giản để loại bỏ các hợp chất axit phenolic và phenol glycozit. Sản phẩm eupatoriopicrin thô nhận được có thể dùng ngay để sản xuất thực phẩm chức năng mà không cần tiếp bước tinh chế đến hoạt chất tinh khiết.

Giải pháp hữu ích sử dụng nguyên liệu lá cây yên bạch Nhật. Đây là loại nguyên liệu tái tạo được và có thể thu hoạch được nhiều lần, đảm bảo sự ổn định trong trồng trọt và thu nhập cho nông dân.

Quy trình chiết của giải pháp hữu ích có thể được triển khai với quy mô lớn.

Hoạt chất thiên nhiên eupatoriopicrin được chiết tách từ dược liệu an toàn, có độ tinh khiết cao và có thể sử dụng trong bào chế các thuốc có tác dụng tiêu diệt tế bào ung thư phổi, sarcoma mô mềm (sarcoma xơ) ảnh hưởng đến mô xơ trong tay, chân và thân thể, ung thư gan và ung thư vú người.

Hoạt chất thiên nhiên eupatoriopicrin có thể được dùng làm hóa chất chuẩn hóa các chế phẩm dược điều chế từ lá cây yên bạch Nhật dùng trong điều trị các bệnh ung thư phổi, sarcoma mô mềm, ung thư gan và ung thư vú người.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình chiết và tinh sạch eupatoriopicrin từ nguyên liệu lá cây yên bạch Nhật (*Eupatorium japonicum* Thunb.) bao gồm các bước sau:

- chuẩn bị lá khô cây yên bạch Nhật đạt tiêu chuẩn nguyên liệu: lá tươi được rửa sạch, phơi khô trong không khí trong bóng râm, sau đó được sấy tiếp trong tủ sấy ở 45°C trong một ngày;
- xay lá khô thành bột mịn để tăng diện tích tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi chiết nhằm tối ưu hiệu suất chiết các hợp chất hữu cơ có trong lá;
- ngâm chiết bột lá khô (2 kg) trong metanol ở nhiệt độ phòng trong 3 ngày, lọc thu dịch chiết metanol, bã lọc được ngâm chiết tiếp với metanol với quy trình được thực hiện 3 lần;
- các dịch chiết metanol được gộp lại cất loại metanol dưới áp suất giảm ở 50°C cho một phần chiết metanol, phần chiết này được hòa thêm nước cất và chiết lần lượt các chất theo độ phân cực giữa pha nước và dung môi hữu cơ có độ phân cực tăng dần *n*-hexan và diclometan;
- dịch chiết nước được cho chạy qua cột sắc ký Diaion HP-20 (Mitsubishi, Nhật Bản) loại bỏ đường, muối và các tạp chất tan trong nước với các hệ dung môi H₂O, 20% và 40% MeOH-H₂O, sau đó thu nhận phân đoạn giàu eupatoriopicrin với 60% MeOH-H₂O và cất loại dung môi dưới áp suất giảm;
- loại bỏ các loại bỏ các hợp chất phenol và phenol glycozit có nhiều trong phân đoạn 60% MeOH-H₂O bằng cách thêm từ từ dung dịch NaOH 10%, thêm nước cất và chiết eupatoriopicrin thô từ dịch nước bằng diclometan; và
- eupatoriopicrin tinh thể nhận được thông qua tinh chế cột sắc ký thường (CC) eupatoriopicrin thô với silica gel (40-63 μ m), rửa giải với hệ dung môi diclometan-axeton 9:1 (v/v).