



(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)



2-0002332

(51) A61K 36/00
2019.01

(13) **Y**

(21) 2-2017-00270

(22) 31/08/2017

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/12/2017 357A

(73) Trường Đại học Bách khoa Hà Nội (VN)

Số 1 Đại Cồ Việt, quận Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội

(72) Đỗ Thị Hoa Viên (VN); Trần Văn Lộc (VN).

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT HỖN HỢP ALKALOIT TỪ LÁ CÂY ĐU ĐỦ (CARICA
PAPAYA L.)**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp alkaloit từ lá cây đu đủ *Carica papaya* L., trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) xử lý nguyên liệu; b) thu cao chiết tổng; c) loại tạp chất; d) thu alkaloit tổng; và e) thu hỗn hợp alkaloit. Quy trình này cho phép điều chỉnh độ phân cực của alkaloit dựa trên việc điều chỉnh pH của dung dịch chiết, cho phép chiết phân đoạn bằng dung môi diclometan để thu được alkaloit chứa carpaine với hiệu suất và độ tinh khiết cao. Hỗn hợp alkaloit thu được từ quy trình theo giải pháp thể hiện khả năng ức chế tế bào ung thư giúp hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực hóa học các hợp chất tự nhiên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất hỗn hợp alkaloit từ lá cây đu đủ *Carica papaya* L. có hiệu quả trong việc ức chế tế bào ung thư. Hỗn hợp alkaloit thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích cho thấy có khả năng ứng dụng để sản xuất chế phẩm hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Việc khai thác ứng dụng các hợp chất có nguồn gốc thiên nhiên trong điều trị và hỗ trợ điều trị ung thư đang ngày càng được quan tâm nghiên cứu ở Việt Nam cũng như ở nhiều nước trên thế giới. Lá đu đủ đã được người dân một số nước như Úc, Mehico, Việt Nam sử dụng hiệu quả trong hỗ trợ điều trị ung thư. Đã có nhiều công bố khoa học về tác dụng phòng chống ung thư của lá đu đủ ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Alkaloit trong lá đu đủ với thành phần chính là carpaine đã được chứng minh là có hoạt tính gây độc đối với một số dòng tế bào ung thư đã thử nghiệm như ung thư phổi, ung thư vú, ung thư máu và ung thư biểu mô.

Đã có nhiều kỹ thuật nhằm chiết alkaloit từ lá cây đu đủ để phát triển dược phẩm, tuy nhiên, những phương pháp này cho hiệu suất không cao, ví dụ, tài liệu “Hồ Thị Hà, carpainone: alkaloid mới từ lá cây đu đủ, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 52(5)(2014)” đề cập đến phương pháp chiết alkaloit từ lá cây đu đủ, trong đó phương pháp này sử dụng dung môi metanol và diclometan để chiết, tuy nhiên, hiệu suất chiết alkaloit rất thấp, không hữu dụng trong sản xuất nguyên liệu dược.

Quy trình chiết alkaloit tổng từ thực vật để phát triển thành sản phẩm thường bao gồm các bước xử lý nguyên liệu, chiết bằng etanol 95%, chiết tiếp phân đoạn bằng cloroform, loại tạp chất bằng n-hexan, sau khi loại dung môi thu được alkaloit tổng số. Phương pháp này thường cho hiệu suất chiết tốt, tuy nhiên, việc chiết này thường không chọn lọc và cho phép thu được một loạt các thành phần tạp chất có khả năng tan trong dung môi, các thành phần này cần được loại bỏ trước khi sử dụng làm dược phẩm.

Mặc dù đã biết đặc tính chung về alkaloit trong thực vật, tùy theo loại alkaloit, chúng thường không tan trong nước, dễ tan trong dung môi hữu cơ. Đặc biệt các alkaloit đều có đặc tính bazơ yếu, nên có thể giải phóng ra khỏi muối bằng kiềm trung bình hoặc mạnh, đồng thời chúng có khả năng tác dụng được với axit tạo ra các muối tương ứng. Do đặc tính này nên việc chiết alkaloit thường sử dụng dung môi ít phân cực để chiết, sản phẩm thường bao gồm nhiều loại alkaloit và các tạp chất có đặc tính tương đồng.

Do đó, cần có quy trình chiết alkaloit hiệu quả, cho phép chiết được nhóm alkaloit với độ tinh sạch đáp ứng yêu cầu làm dược chất và hiệu suất đủ cao để sử dụng làm dược phẩm. Cụ thể cần có quy trình chiết alkaloit từ lá đu đủ với hiệu suất cao và độ tinh sạch để phát triển làm nguyên liệu sản xuất thuốc điều trị bệnh ung thư.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, theo đó giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất hỗn hợp alkaloit từ lá cây đu đủ, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) xử lý nguyên liệu bằng cách làm sạch lá đu đủ *Carica papaya* L., thái nhỏ, sấy khô đến độ ẩm nằm trong khoảng từ 8,5 đến 9,5 % rồi nghiền nhỏ đến kích thước khoảng 1 mm thu được bột lá đu đủ khô;

b) thu cao chiết tổng bằng cách chuyển bột lá đu đủ khô thu được ở bước (a) vào thiết bị chiết gia nhiệt có cánh khuấy, bổ sung etanol 80% để làm ẩm trong 30 phút, tiếp đó bổ sung etanol 80% sao cho tổng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/5, gia nhiệt đến 60°C và chiết trong thời gian 3 giờ trong điều kiện khuấy, quá trình chiết được thực hiện lặp lại 3 lần, sau khi thu gom dịch chiết, cất thu hồi dung môi ở điều kiện áp suất giảm ở nhiệt độ 50°C thu được cao chiết tổng chứa 25-30% hàm lượng ẩm;

c) loại tạp chất bằng cách axit hóa alkaloit có trong cao chiết tổng thu được ở bước (b) bằng cách bổ sung HCl 5% cho đến pH = 5, tiếp đó bổ sung diclometan theo tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích), khuấy đều để chiết loại tạp chất tan trong diclometan, lặp lại bước chiết này 3 lần, thu phân đoạn chứa alkaloit tổng không tan trong diclometan;

d) thu alkaloit tổng bằng cách kiềm hóa phân đoạn alkaloit tổng bằng NH₄OH 10% đến pH=8,5, tiếp đó bổ sung diclometan theo tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích), khuấy đều để

chiết alkaloit tổng, thu phân đoạn diclometan, lặp lại bước này 3 lần, thu phân đoạn diclometan chứa alkaloit tổng số; và

e) thu hỗn hợp alkaloit bằng cách chuyển phân đoạn diclometan chứa alkaloit tổng số vào thiết bị cô quay chân ở nhiệt độ 50°C để loại dung môi, thu alkaloit tổng và sấy chân không ở nhiệt độ 50°C đến khi hàm ẩm khoảng 4% để thu hỗn hợp alkaloit dạng bột.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả với những ví dụ và các phương án thực hiện cụ thể. Tuy nhiên, các ví dụ và các phương án thực hiện này chỉ nhằm mô tả làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề cập đến sản xuất hỗn hợp alkaloit từ lá cây đu đủ, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) xử lý nguyên liệu; b) thu cao chiết tổng; c) loại tạp chất; d) thu alkaloit tổng; và e) thu hỗn hợp alkaloit.

Nguyên liệu được sử dụng để chiết alkaloit theo giải pháp hữu ích là lá của cây đu đủ *Carica papaya* L. thuộc họ Đu đủ. Cây đu đủ là cây thân thảo to, không hoặc ít khi có nhánh, cao từ 3 đến 10 mét, lá to hình chân vịt, cuống dài, đường kính 50 đến 70 cm. Lá được sử dụng tốt nhất là loại lá bánh tẻ.

Trong bước xử lý nguyên liệu, tiến hành bằng cách làm sạch lá đu đủ *Carica papaya* L., thái nhỏ, sấy khô đến độ ẩm nằm trong khoảng từ 8,5 đến 9,5 %. Tiếp đó nghiền nhỏ đến kích thước khoảng 1 mm thu được bột lá đu đủ khô.

Trong bước thu cao chiết tổng, tiến hành chuyển bột lá đu đủ khô thu được ở trên vào thiết bị chiết gia nhiệt có cánh khuấy. Dung môi được sử dụng để chiết cao tổng là etanol 80%. Dùng etanol 80% để làm ẩm nguyên liệu trong 30 phút. Lượng etanol 80% được sử dụng làm ẩm vào khoảng 2 lần trọng lượng của lá khô. Sau khi làm ẩm, bổ sung etanol 80% sao cho tổng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/5. Tiếp đó, gia nhiệt đến 60°C và tiến hành chiết trong thời gian 3 giờ trong điều kiện khuấy. Quá trình chiết được thực hiện lặp lại 3 lần. Sau khi thu gom dịch chiết, gộp chung phần dịch chiết và tiến hành cất

thu hồi dung môi trong điều kiện áp suất giảm ở nhiệt độ 50°C. Phần cao chiết tổng thu được ở dạng cao chiết lỏng, màu nâu, chứa 25-30% hàm lượng ẩm.

Vi trong thực vật, alkaloit thường tồn tại ở dạng bazơ và một ít ở dạng muối nên việc sử dụng etanol 80% để chiết thu cao chiết tổng cho phép chiết được cao chiết tổng mà không cần sơ chế nguyên liệu bằng amoniac nếu chiết bằng etanol 95%.

Nhiệt độ chiết ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng alkaloit có trong chế phẩm thu được. Các tác giả đã nghiên cứu và phát hiện ra rằng, với nhiệt độ chiết tối đa 60°C, sản phẩm thu được sẽ có hiệu suất và hoạt tính tối ưu. Nếu nhiệt độ tăng quá cao, alkaloit thu được bị biến tính, giảm hoạt tính sinh học của chế phẩm thu được. Việc chiết trong điều kiện khuấy, nhiệt độ chiết 60°C trong thiết bị gia nhiệt có cánh khuấy giúp giảm được thời gian chiết với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi tối ưu là 1/5 (trọng lượng/thể tích).

Trong bước loại tạp chất, tiến hành axit hóa alkaloit có trong cao chiết tổng bằng cách bổ sung HCl 5% cho đến pH = 5. Việc axit hóa này được thực hiện nhằm chuyển độ phân cực của alkaloit từ dạng trung tính sang dạng axit hòa tan trong nước, nhưng không tan trong dung môi hữu cơ. Sau khi axit hóa, bổ sung diclometan theo tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích), khuấy đều để chiết loại tạp chất tan trong diclometan. Các tạp chất không mong muốn tan trong diclometan, nhưng không tan trong nước không mong muốn bao gồm chlorophyl, các axit béo, pectin, carotenoit. Bước chiết phân đoạn này được lặp lại 3 lần. Phân đoạn chứa alkaloit tổng không tan trong diclometan nằm trong pha nước bên dưới. Sau khi loại bỏ pha diclometan, thu phân đoạn chứa alkaloit tổng.

Trong bước thu alkaloit tổng, tiến hành kiềm hóa phân đoạn alkaloit tổng bằng NH₄OH 10% đến pH=8,5. Việc kiềm hóa này được thực hiện nhằm chuyển độ phân cực của alkaloit từ dạng axit tan trong nước thành dạng bazơ tan trong dung môi hữu cơ. Bằng kỹ thuật chuyển độ phân cực này, cho phép chiết chọn lọc được alkaloit. Sau khi kiềm hóa, bổ sung diclometan theo tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích), khuấy đều để chiết alkaloit tổng. Theo đó, những tạp chất tan trong diclometan đã được chiết ở phân đoạn trước sẽ không còn, nên bước chiết này sẽ chỉ chiết alkaloit có trong dung môi. Đây là một cách chiết chọn lọc, giúp giảm thời gian và tăng hiệu suất chiết, đồng thời đơn giản hóa quy trình chiết. Tiến hành chiết bằng diclometan 3 lần, thu phân đoạn diclometan chứa alkaloit tổng số.

Bằng việc axit hóa cao chiết tổng để chuyển toàn bộ alkaloit về dạng muối tan trong nước và sử dụng diclometan để loại các tạp chất không phải alkaloit rồi kiềm hóa dịch nước thu được để chuyển toàn bộ alkaloit về dạng bazơ, rồi lại sử dụng chính diclometan để chiết thu hỗn hợp alkaloit là một cải tiến của quy trình nhằm thu được hỗn hợp alkaloit có độ tinh sạch cao do sự đặc hiệu của dung môi sử dụng. Quy trình không những giảm được loại dung môi sử dụng mà còn có thể giúp tái sử dụng hiệu quả dung môi diclometan trong quá trình chiết xuất.

Trong bước thu hỗn hợp alkaloit, tiến hành chuyển phân đoạn diclometan chứa alkaloit tổng số vào thiết bị cô quay chân ở nhiệt độ 50°C để loại dung môi. Quá trình thu alkaloit tổng được thực hiện bằng cách sấy chân không ở nhiệt độ 50°C đến khi hàm ẩm khoảng 4% để thu hỗn hợp alkaloit dạng bột.

Hỗn hợp alkaloit thu được từ quy trình theo giải pháp hữu ích có độ tinh khiết phù hợp để sản xuất dược, chứa chủ yếu hoạt chất carpaine, là một hoạt chất đã được chứng minh là có tác dụng diệt tế bào ung thư.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Sản xuất hỗn hợp alkaloit từ lá đu đủ

Lá đu đủ loại bánh tẻ, thuộc giống đu đủ Đài Loan có tên khoa học là *Carica papaya* L. (họ đu đủ: Caricaceae) được thu hái ở xã Nam Hồng, huyện Đông Anh, Hà Nội khi cây đu đủ được 8-9 tháng tuổi và đã thu hoạch quả; lá sau khi làm sạch, sấy khô đến độ ẩm khoảng 9%, được nghiền nhỏ và rây qua sàng kích thước ≤ 1 mm thu bột lá đu đủ khô.

Cân 20 kg bột lá đu đủ khô chuyển vào thiết bị chiết dung tích 150 lít có cánh khuấy và gia nhiệt. Bổ sung 20 lít etanol 80% vào khuấy đều để làm ẩm và ngâm trong 30 phút. Tiếp đó, bổ sung 80 lít etanol 80% (tổng cộng là 100 lít etanol 80%) và gia nhiệt đến 60°C và khuấy trong 3 giờ.

Sau khi chiết, lọc thu được dịch chiết lần 1, tiếp tục lặp lại quá trình chiết 3 lần, mỗi lần với 80 lít etanol 80%. Dịch chiết được gộp lại, cất loại dung etanol 80% bằng thiết bị cô quay chân không ở 50°C cho đến khi còn 6 lít dịch màu nâu sánh.

Bổ sung 1 lít dung dịch HCl 5% để điều chỉnh đến pH=5, chiết tiếp bằng diclometan (3 lần x 6 lít/1 lần) để loại các tạp chất tan trong diclometan. Phần dịch nước sau được khi chiết bằng diclometan được kiềm hóa bằng dung dịch NH₄OH 10% đến pH = 8,5. Chiết tiếp phần dịch nước bằng diclometan (3 lần x 6 lít/ 1 lần). Phần đoạn diclometan được cất loại dung môi, thu phần cao chiết alkaloit tổng. Phần cao chiết được sấy chân không ở nhiệt độ 50°C thu được 40,2 g hỗn hợp alkaloit có độ ẩm 1,01% - đạt hiệu suất 0,2 % so với nguyên liệu lá đu đủ khô. Kết quả phân tích định lượng bằng HPLC-MS cho thấy hỗn hợp alcaloit dạng bột có độ ẩm ≤ 4%, chứa hoạt chất carpaine.

Ví dụ 2: Thử nghiệm hoạt tính gây độc các dòng tế bào ung thư (cytotoxic assay) của hỗn hợp alkaloit

Vật liệu và phương pháp

Phương pháp đánh giá dựa trên kỹ thuật nhuộm protein của tế bào với sulforhodamin B (SRB), tiếp đến đo độ hấp phụ quang của phức màu SRB gắn trên tế bào. Hàm lượng protein tế bào tỷ lệ thuận với giá trị OD đo được. Dựa vào kết quả xác định hàm lượng protein tế bào tổng số có thể xác định được khả năng ức chế tế bào ung thư.

Môi trường nuôi cấy tế bào ung thư gồm: L-glutamin 2 mM; 1,5 g/l natri bicarbonat; 4,5 g/l glucoza; HEPES 10 mM (hệ đệm hóa chất) và natri pyruvat 1 mM, ngoài ra bổ sung 10% huyết thanh thai bò – FBS (GIBCO).

Tế bào thử nghiệm bao gồm tế bào ung thư phổi LU-1, tế bào ung thư biểu mô KB, tế bào ung thư vú MCF7.

Chất thử nghiệm: hỗn hợp alkaloit thu được từ ví dụ 1 (TN). Ellipticine (Sigma) được sử dụng như là chất đối chứng dương (ĐC1). DMSO 10% được sử dụng như đối chứng âm (ĐC2).

Các bước tiến hành

Lấy 20 µl hỗn hợp thu được từ ví dụ 1 pha trong DMSO 10%, tiếp đó bổ sung vào các giếng của khay 96 giếng để có nồng độ cuối cùng là 100 µg/ml; 20 µg/ml; 4 µg/ml; 0,8 µg/ml.

Trypsin hóa tế bào để làm rời tế bào và điều chỉnh mật độ cho phù hợp với thí nghiệm ($3-7 \times 10^4$ tb/ml) bằng cách đếm trong buồng đếm hồng cầu.

Bổ sung vào các giếng (đã có 180 μ l môi trường nuôi cấy) lượng tế bào phù hợp và nuôi cấy từ 3 đến 5 ngày trong tủ ấm CO₂, tế bào được cố định vào đáy giếng bằng TCA (axit trichloroacetic) trong 30 phút, được nhuộm bằng SRB trong 1 giờ ở 37°C. Loại bỏ SRB dư và rửa 3 lần bằng 5% axit axetic rồi để khô trong không khí ở nhiệt độ phòng.

Mẫu đối chứng ngày 0 tiến hành trên 1 khay 96 giếng khác, không có chất thử, nhưng có tế bào ung thư. Sau 1 giờ, đĩa đối chứng được cố định tế bào bằng TCA.

Cuối cùng, sử dụng 10 mM dung dịch đệm Tris để hòa tan lượng SRB đã bám và nhuộm các phân tử protein, lắc đĩa lắc nhẹ trong 10 phút trên máy lắc và sử dụng máy ELISA Plate Reader (Bio-Rad) để đọc kết quả ở bước sóng 515 nm. Khả năng sống sót của tế bào khi có mặt chất thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ tế bào sống (\%)} = \frac{OD_1 - OD_0}{OD_2 - OD_0} \times 100$$

Trong đó:

OD₁: Mật độ quang của mẫu tế bào trong điều kiện nghiên cứu.

OD₂: Mật độ quang của mẫu tế bào trong điều kiện đối chứng âm.

OD₀: Mật độ quang của mẫu tế bào tại thời điểm bắt đầu thí nghiệm.

Ellipticine (Sigma) được sử dụng như là chất đối chứng dương (ĐC1). DMSO10% được sử dụng như đối chứng âm (ĐC2).

Giá trị IC₅₀ (nồng độ ức chế 50% sự phát triển của tế bào) sẽ được xác định nhờ vào phần mềm TableCurve, dựa vào đường cong phát triển tế bào và nồng độ chế phẩm thử nghiệm để tính giá trị IC₅₀ theo công thức:

$$1/Y = a + b \cdot \ln X$$

Trong đó: Y là nồng độ chế phẩm và X là tỷ lệ tế bào sống.

Nếu mẫu thử có IC₅₀ \leq 20 μ g/ml sẽ được xem là có hoạt tính gây độc tế bào và có khả năng ức chế sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư.

Kết quả thử nghiệm

Kết quả thử nghiệm được trình bày trong bảng 1 bên dưới:

Bảng 1: Khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư thử nghiệm của hỗn hợp alkaloit

Nồng độ chế phẩm ($\mu\text{g/ml}$)	Tỷ lệ ức chế tế bào ung thư (%)		
	LU-1	KB	MCF-7
100	100,92	73,34	100,71
20	50,27	52,71	51,38
4	27,13	12,09	21,22
0,8	7,56	-0,20	4,86
IC50 của TN ($\mu\text{g/ml}$)	18,21	18,44	19,16
IC50 ($\mu\text{g/ml}$) của ĐC1	0,97	0,99	0,89

(ĐC1 được thử nghiệm ở các nồng độ 10; 2; 0,4 và 0,08 $\mu\text{g/ml}$)

Kết quả ở bảng 1 cho thấy giá trị IC50 của hỗn hợp alkaloit thu được từ ví dụ 1 đối với 3 dòng tế bào ung thư thử nghiệm đều < 20 $\mu\text{g/ml}$. Như vậy hỗn hợp alkaloit có tác dụng diệt các dòng tế bào ung thư phổi (LU-1), ung thư biểu mô (KB) và ung thư vú (MCF-7) vượt trội so với đối chứng là Elipticine.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích cho phép sản xuất được hỗn hợp alkaloit với hiệu suất đủ để ứng dụng sản xuất phát triển nguồn dược liệu đáp ứng cho ngành dược phẩm. Quy trình sản xuất alkaloit theo giải pháp hữu ích cho phép thu được sản phẩm có độ tinh sạch cao và có hiệu quả tiêu diệt một số dòng tế bào ung thư, một tiền đề để sản xuất sản phẩm hỗ trợ điều trị ung thư có nguồn gốc từ thực vật.

Bằng cách điều chỉnh các điều kiện chiết, khống chế nhiệt độ chiết, thay đổi độ phân cực của alkaloit bằng cách điều chỉnh pH, cho phép chiết alkaloit chọn lọc với hiệu suất cao tới 0,2%.

Phương pháp sản xuất alkaloit cho phép chiết chọn lọc được nhóm hợp chất có tác dụng tiêu diệt dòng tế bào ung thư phổi, ung thư biểu mô và ung thư vú, cho phép tận dụng được nguồn nguyên liệu là phế phụ nông nghiệp giúp phát triển bền vững nông nghiệp, tăng hiệu suất canh tác cho nông dân.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất hỗn hợp alkaloit từ lá cây đu đủ, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) xử lý nguyên liệu bằng cách làm sạch lá đu đủ *Carica papaya* L., thái nhỏ, sấy khô đến độ ẩm nằm trong khoảng từ 8,5 đến 9,5 % rồi nghiền nhỏ đến kích thước khoảng 1 mm thu được bột lá đu đủ khô;

b) thu cao chiết tổng bằng cách chuyển bột lá đu đủ khô thu được ở bước (a) vào thiết bị chiết gia nhiệt có cánh khuấy, bổ sung etanol 80% để làm ẩm trong 30 phút, tiếp đó bổ sung etanol 80% sao cho tổng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/5, gia nhiệt đến 60°C và chiết trong thời gian 3 giờ trong điều kiện khuấy, quá trình chiết được thực hiện lặp lại 3 lần, sau khi thu gom dịch chiết, cất thu hồi dung môi ở điều kiện áp suất giảm ở nhiệt độ 50°C thu được cao chiết tổng chứa 25-30% hàm lượng ẩm;

c) loại tạp chất bằng cách axit hóa alkaloit có trong cao chiết tổng thu được ở bước (b) bằng cách bổ sung HCl 5% cho đến pH = 5, tiếp đó bổ sung diclometan theo tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích), khuấy đều để chiết loại tạp chất tan trong diclometan, lặp lại bước chiết này 3 lần, thu phân đoạn chứa alkaloit tổng không tan trong diclometan;

d) thu alkaloit tổng bằng cách kiềm hóa phân đoạn alkaloit tổng bằng NH₄OH 10% đến pH=8,5, tiếp đó bổ sung diclometan theo tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích), khuấy đều để chiết alkaloit tổng, thu phân đoạn diclometan, lặp lại bước này 3 lần, thu phân đoạn diclometan chứa alkaloit tổng; và

e) thu hỗn hợp alkaloit bằng cách chuyển phân đoạn diclometan chứa alkaloit tổng vào thiết bị cô quay chân ở nhiệt độ 50°C để loại dung môi, thu alkaloit tổng và sấy chân không ở nhiệt độ 50°C đến khi hàm ẩm khoảng 4% để thu hỗn hợp alkaloit dạng bột.