



(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)



1-0036650

(51)^{2020.01} C07D 311/00; A61K 31/00; A61P 35/00 (13) B

(21) 1-2020-05879

(22) 14/10/2020

(45) 25/08/2023 425

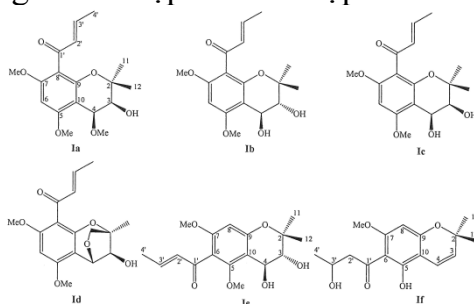
(43) 25/02/2021 395

(73) Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
Số 18 đường Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Xuân Nhiệm (VN); Phan Văn Kiệm (VN); Châu Văn Minh (VN); Phạm Văn Cường (VN); Nguyễn Hoài Nam (VN); Bùi Hữu Tài (VN); Dương Thị Hải Yến (VN); Phạm Hải Yến (VN); Nguyễn Hoàng Anh (VN); Phạm Thế Chính (VN); Nguyễn Thế Cường (VN).

(54) HỢP CHẤT MALLOAPELTA VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP HỢP CHẤT NÀY TỪ LOÀI BÙM BỤP MALLOTUS APELTA

(57) Sáng chế đề cập đến các hợp chất malloapelta có công thức (Ia) đến (If) sau đây:



I

và phương pháp phân lập các hợp chất này từ loài bùm bụp *Mallotus apelta*. Các hợp chất malloapelta theo sáng chế có tác dụng ức chế sự phát triển tế bào ung thư. Các hợp chất malloapelta và phương pháp phân lập các hợp chất này theo sáng chế rất hữu ích trong việc làm cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng nhằm tạo ra các sản phẩm có tác dụng điều trị/hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc từ thiên nhiên có tác dụng ức chế sự phát triển tế bào ung thư nhằm nghiên cứu ứng dụng chữa ung thư. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các hợp chất malloapelta có cấu trúc hóa học mới và phương pháp chiết các hợp chất này từ loài bùm bụp *Mallotus apelta* ở Việt Nam.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ung thư là một căn bệnh đa diện, đại diện cho nguyên nhân tử vong hàng đầu. Xu hướng sử dụng nguồn dược liệu tự nhiên nói chung, đặc biệt là các hợp chất có nguồn gốc từ thực vật để chữa trị một số bệnh nhiệt đới và những bệnh hiểm nghèo đã và đang là mối quan tâm không chỉ của ngành dược ở nước ta mà còn của các nước trong khu vực cũng như các nước trên thế giới. Nhiều cây thuốc đã được phát hiện có tác dụng kháng sự phát triển tế bào ung thư. Từ nhiều cây thuốc, các nhà khoa học đã tiến hành nghiên cứu và phát hiện được nhiều hợp chất có tác dụng trong điều trị ung thư như vinblastine và vincristine từ loài dừa cạn *Catharanthus roseus* G, paclitaxel từ loài *Taxus brevifolia* Nutt, Camptothecin từ loài hỷ thụ *Camptotheca acuminata*, Podophyllotoxin từ loài táo ma *Podophyllum peltatum* (xem Phytochemistry Letters 7 (2014) 173-181).

Loài bùm bụp *Mallotus apelta* nhận được rất nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới. Theo Võ Văn Chi (Từ điển cây thuốc Việt Nam, nhà xuất bản Y học năm 2012), loài Bùm bụp có vị hơi đắng, chát, tính bình. Rễ có tác dụng hoạt huyết, bổ vị tràng. Lá và vỏ thân có tác dụng tiêu viêm, cầm máu. Rễ dùng chữa viêm gan mãn tính, sưng gan lá lách, sa tử cung và trực tràng, huyết trắng, phù thũng khi có thai, viêm ruột ỉa chảy.v.v.. Lá và vỏ thân chống nôn, chữa viêm loét hành tá tràng, cầm máu. Ngoài ra còn được dùng chữa trị viêm tai giữa, cụm nhọt, các tổn thương và chảy máu.

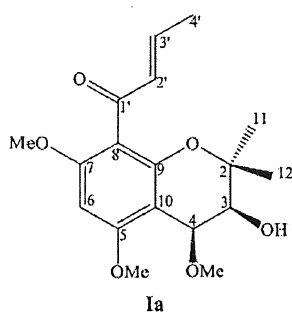
Trong quá trình nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng ức chế sự phát triển tế bào ung thư từ loài bùm bụp *Mallotus apelta*, nhóm các tác giả sáng chế đã phân lập được các hợp chất có cấu trúc hóa học mới thuộc lớp chất có dạng khung chromene. Đây là một phát hiện hoàn toàn mới với các hợp chất (còn được gọi là malloapelta) chưa được

phát hiện từ trước đến nay trên thế giới. Tất cả các hợp chất này đã được đánh giá tác dụng ức chế sự phát triển tế bào ung thư vú (TOV-21G)

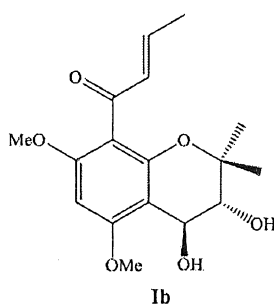
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất các hợp chất malloapelta thuộc lớp chất có dạng khung chromene thể hiện tác dụng ức chế mạnh sự phát triển tế bào ung thư vú TOV-21G và phương pháp phân lập các hợp chất malloapelta loài bươm bực *Mallotus apelta* để thực hiện và cho độ tinh khiết cao, có thể phát triển thực hiện để tạo sản phẩm có tính ứng dụng trong điều trị/hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

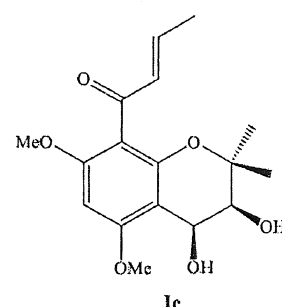
Để đạt được mục đích trên đây, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất hợp chất malloapelta C-H có công thức (Ia) đến (If) sau đây:



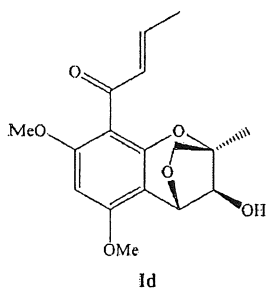
(malloapelta C)



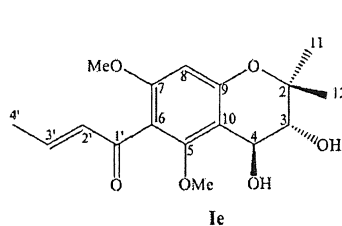
(malloapelta D)



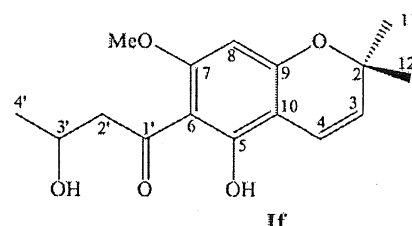
(malloapelta E)



(malloapelta F)



(malloapelta G)



(malloapelta H)

Theo một phương án, hợp chất này là (3*S**,4*S**)-8-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-4,5,7-trimethoxy-2,2-dimethylchroman-3-ol (malloapelta C).

Theo một phương án khác, hợp chất này là (3*R**,4*S**)-8-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-5,7-dimethoxy-2,2-dimethylchroman-3,4-diol (malloapelta D).

Theo một phương án khác nữa, hợp chất này là (3*S**,4*S**)-8-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-5,7-dimethoxy-2,2-dimethylchroman-3,4-diol (malloapelta E).

Theo một phương án khác nữa, hợp chất này là (2*S**,3*S**,4*S**)-8-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-5,7-dimetoxy-4,11-epoxy-2,2-dimethylchroman-3-ol (malloapelta F).

Theo một phương án khác nữa, hợp chất này là (3*R**,4*S**)-6-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-5,7-dimetoxy-2,2-dimethylchroman-3,4-diol (malloapelta G).

Theo một phương án khác nữa, hợp chất này là 6-(1-oxo-3-hydroxybutyl)-7-metoxy-2,2-dimethyl-2*H*-chromen-5-ol and (malloapelta H).

Các hợp chất malloapelta C-H theo sáng chế thể hiện tác dụng ức chế mạnh sự phát triển tế bào ung thư vú có thể sử dụng để phát triển các sản phẩm điều trị/hỗ trợ điều trị bệnh ung thư.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp tách chiết các hợp chất malloapelta C-H trên đây từ loài bùm bụp *Mallotus apelta*, phương pháp này bao gồm các bước:

- (i) thu gom, thái nhỏ, phơi khô, nghiền thành bột mẫu lá loài bùm bụp *Mallotus apelta*, sau đó chiết siêu âm bột này 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần tối thiểu 60 phút;
- (ii) gộp các dịch chiết trong rượu metylic thu được ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô trong rượu metylic, được ký hiệu là dịch cô MA;
- (iii) phân bố đều dịch cô MA với nước cất rồi chiết phân bố với diclorometan, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích (v/v), sau đó tiến hành loại bỏ dung môi của dịch chiết diclorometan dưới áp suất giảm thu được dịch cô diclorometan, được ký hiệu là dịch cô MA1;
- (iv) tiến hành phân tách dịch cô MA1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ 100/1 đến 0/1 thu được năm phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là MA1A đến MA1E;
- (v) hòa tan phân đoạn MA1B vào hỗn hợp dung môi diclorometan/axeton với tỷ lệ 2/1 về thể tích và tiến hành phân tách trên sắc ký trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), tỷ lệ MA1B/silica gel là 1/2 về khối lượng, hệ dung môi rửa giải diclorometan/axeton (40/1, v/v), thu được bốn phân đoạn, được ký hiệu là MA1B1 đến MA1B4;

(vi) hòa tan phân đoạn MA1B3 vào hỗn hợp dung môi *n*-hexan/ethyl axetat với tỷ lệ 4/1 về thể tích và tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), tỷ lệ MA1B3/silica gel là 1/2 về khối lượng), hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/ethyl acetat (4/1, v/v), thu được ba phân đoạn, được ký hiệu là MA1B3A đến MA1B3C;

(vii) tách các hợp chất malloapelta C-H, trong đó:

- tiến hành sắc ký phân đoạn MA1B3B trên cột pha đảo (RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μ m, Fuji silysia Chemical Ltd.) thu được hợp chất malloapelta H có công thức (If) dưới dạng bột vô định hình;
- hòa tan phân đoạn MA1D bằng diclorometan và tiến hành phân tách trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ diclorometan trong axeton *n*-hexan/axeton tỷ lệ 40/1-5/1 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ MA1D1 đến MA1D4;

tiếp tục tiến hành sắc ký phân đoạn MA1D1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μ m, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/2 về thể tích, tạo ra ba phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu từ MA1D1A-MA1D1C.

tiến hành sắc ký phân đoạn MA1D1A trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 $\times$ 150 mm), dung môi axetonitril 30% trong nước, cho các hợp chất malloapelta E có công thức (Ic) và malloapelta F có công thức (Id) dưới dạng bột vô định hình;

tiến hành chạy sắc ký phân đoạn MA1D1B trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 $\times$ 150 mm), dung môi axetonitril 30% trong nước, cho các hợp chất malloapelta D có công thức (Ib) dưới dạng bột vô định hình;

(ix) tiến hành sắc ký phân đoạn MA1D3 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μ m, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.) với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/2 về thể tích, tạo ra hai phân đoạn, được ký hiệu MA1D3A và MA1D3B;

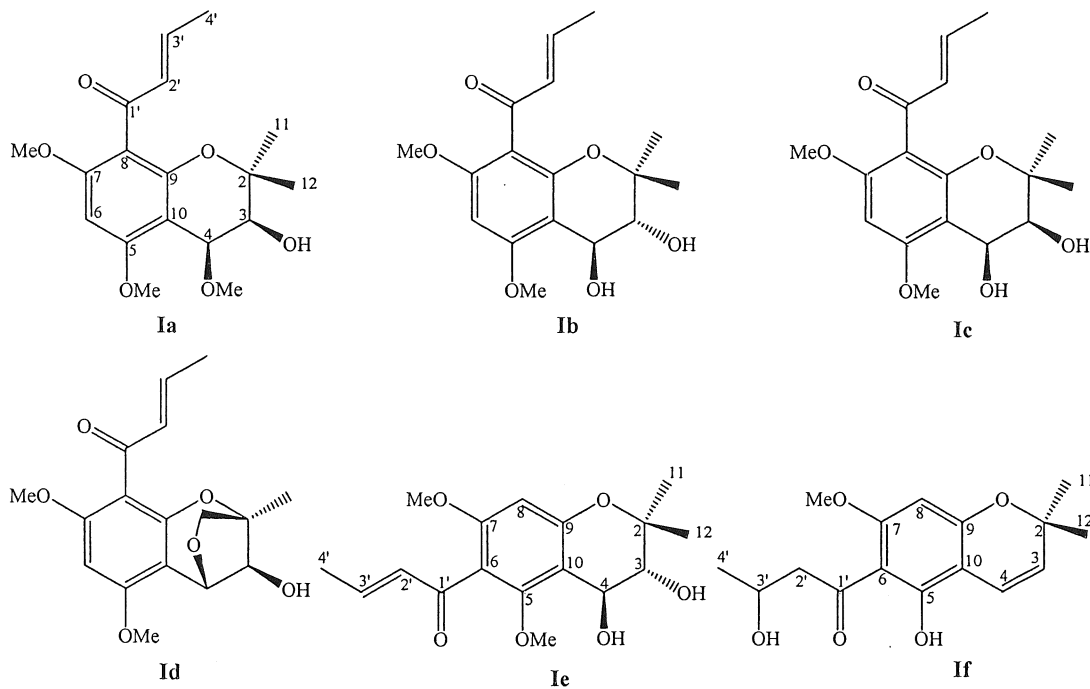
tiếp tục tiến hành sắc ký phân đoạn MA1D3A trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 × 150 mm), dung môi axetonitril 30% trong nước thu được hợp chất malloapelta G có công thức (Ie);

tiếp tục tiến hành sắc ký phân đoạn MA1D3B trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 × 150 mm), dung môi axetonitril 40% trong nước thu được hợp chất malloapelta C có công thức (Ia) dưới dạng bột vô định hình.

Mô tả chi tiết sáng chế

Mẫu loài bùm bụp *Mallotus apelta* (Lour.) Müll.Arg. được thu tại Ngọc Thanh, Phúc Yên, Vĩnh Phúc tháng 8 năm 2018. Tên khoa học được giám định bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật. Mẫu tiêu bản (MA1808) được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển. Mẫu lá tươi loài bùm bụp *Mallotus apelta* (40 kg) được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột, sau đó bột này (5,0 kg) được chiết ngâm bằng siêu âm 3 lần, mỗi lần 60 phút, với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C sau đó tiến hành chiết xuất, phân lập, và xác định cấu trúc hóa học theo các phương pháp mô tả dưới đây: Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn (loại DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1,05715) hoặc RP18 F254s (Merck)). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch H₂SO₄ 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu. Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel hoặc pha đảo. Silica gel có cỡ hạt là 40-63 µm (230-400 mesh, Merck). Pha đảo RP-18 (30 - 50 µm, Fuji silysia Chemical Ltd). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy Bruker 500 MHz. Phổ khối lượng phân giải cao được đo trên máy Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS system.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các hợp chất malloapelta có công thức (Ia) đến (If) sau đây:



Các hợp chất malloapelta này là các hợp chất có cấu trúc hóa học mới. Các thông số hóa lý của các hợp chất này như sau:

Hợp chất malloapelta C có công thức (Ia) hay (3*S**,4*S**)-8-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-4,5,7-trimethoxy-2,2-dimethylchroman-3-ol (malloapelta C).

+ Công thức phân tử: C₁₈H₂₄O₆;

+ Khối lượng phân tử: M = 336;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ 0,0° (*c* 0,1, CHCl₃);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại *m/z* 337,1646 [M+H]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức [C₁₈H₂₅O₆]⁺, 337,1646);

Hợp chất malloapelta D có công thức (Ib) hay (3*R**,4*S**)-8-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-5,7-dimethoxy-2,2-dimethylchroman-3,4-diol (malloapelta D).

+ Công thức phân tử: C₁₇H₂₂O₆;

Khối lượng phân tử: M = 322;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ 0,0° (*c* 0,1, CHCl₃);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 323,1490 [M+H]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức [C₁₇H₂₃O₆]⁺, 323,1489);

Hợp chất malloapelta E có công thức (Ic) hay (3*S**,4*S**)-8-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-5,7-dimethoxy-2,2-dimethylchroman-3,4-diol (malloapelta E).

+ Công thức phân tử: C₁₇H₂₂O₆;

Khối lượng phân tử: M = 322;

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ 0,0° (*c* 0,1, CHCl₃);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 323,1489 [M+H]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức [C₁₇H₂₃O₆]⁺, 323,1489);

Hợp chất malloapelta F có công thức (Id) hay (2*S**,3*S**,4*S**)-8-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-5,7-dimethoxy-4,11-epoxy-2,2-dimethylchroman-3-ol (malloapelta F).

+ Công thức phân tử: C₁₇H₂₀O₆;

+ Khối lượng phân tử: M = 320;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ 0,0° (*c* 0,1, CHCl₃);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 321,1331 [M+H]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức [C₁₇H₂₁O₆]⁺, 321,1333);

Hợp chất malloapelta G có công thức (Ie) hay (3*R**,4*S**)-6-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-5,7-dimethoxy-2,2-dimethylchroman-3,4-diol (malloapelta G).

+ Công thức phân tử: C₁₇H₂₂O₆;

Khối lượng phân tử: M = 322;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ 0,0° (*c* 0,1, CHCl₃);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 323,1493 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{17}H_{23}O_6]^+$, 323,1489);

Hợp chất malloapelta H có công thức (If) hay 6-(1-oxo-3-hydroxybutyl)-7-methoxy-2,2-dimethyl-2*H*-chromen-5-ol và (malloapelta H).

+ Công thức phân tử: $C_{16}H_{20}O_5$;

+Khối lượng phân tử: $M = 292$;

Các thông số vật lý:

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ 0,0° (c 0,1, $CHCl_3$);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 293,1403 $[M+H]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{16}H_{21}O_5]^+$, 293,1384;

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phân lập các hợp chất malloapelta trên đây từ loài loài bùm bụp *Mallotus apelta* gồm các bước sau:

(i) Mẫu lá loài bùm bụp *Mallotus apelta* được thái nhỏ, phơi khô rồi nghiền thành bột, sau đó bột này được chiết siêu âm 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần tối thiểu 60 phút.

(ii) gộp các dịch chiết trong rượu metylic thu được ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô trong rượu metylic, được ký hiệu là dịch cô MA;

(iii) phân bố đều dịch cô MA với nước cất rồi chiết phân bố với diclorometan, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết diclorometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô diclorometan, ký hiệu là dịch cô MA1;

(iv) dịch cô MA1 được tiến hành phân tách trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ 100/1-0/1 thu được năm phân đoạn ký hiệu lần lượt từ MA1A đến MA1E;

(v) hòa tan phân đoạn MA1B vào hỗn hợp dung môi diclorometan/axeton với tỷ lệ 2/1 về thể tích và tiến hành phân tách trên sắc ký trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ

là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), tỷ lệ MA1B/silica gel = 1/2 về khối lượng), hệ dung môi rửa giải diclorometan/axeton (40/1, v/v), thu được bốn phân đoạn ký hiệu là MA1B1 đến MA1B4.

(vi) hòa tan phân đoạn MA1B3 vào hỗn hợp dung môi *n*-hexan/etyl acetat với tỷ lệ 4/1 về thể tích và tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), tỷ lệ MA1B3/silica gel = 1/2 về khối lượng), hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/etyl acetat (4/1, v/v), thu được ba phân đoạn ký hiệu là MA1B3A đến MA1B3C. Phân đoạn MA1B3B được sắc ký trên cột pha đảo (RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μ m, Fuji silysia Chemical Ltd.) thu được hợp chất malloapelta H có công thức (If) dưới dạng bột vô định hình.

(vii) hòa tan phân đoạn MA1D bằng diclorometan và tiến hành phân tách trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ diclorometan trong axeton *n*-hexan/axeton tỷ lệ 40/1-5/1 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ MA1D1 đến MA1D4.

(viii) đưa phân đoạn MA1D1 lên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μ m, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/2 về thể tích, tạo ra ba phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu từ MA1D1A- MA1D1C. Phân đoạn MA1D1A được sắc ký trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 $\times$ 150 mm), dung môi axetonitril 30% trong nước, cho các hợp chất: malloapelta E có công thức (Ic) và malloapelta F có công thức (Id) dưới dạng bột vô định hình. Phân đoạn MA1D1B được sắc ký trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 $\times$ 150 mm), dung môi axetonitril 30% trong nước, cho các hợp chất: malloapelta D có công thức (Ib) dưới dạng bột vô định hình.

(ix) đưa phân đoạn MA1D3 lên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μ m, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.) với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/2 về thể tích, tạo ra hai phân đoạn, được ký hiệu MA1D3A và MA1D3B. Phân đoạn MA1D3A được sắc ký trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 $\times$ 150 mm), dung môi axetonitril 30% trong nước thu được hợp chất: malloapelta G có công thức (Ie). Phân đoạn MA1D3B được sắc ký trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-

80 (20 × 150 mm), dung môi axetonitril 40% trong nước thu được hợp chất: malloapelta C có công thức (Ia) dưới dạng bột vô định hình.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập các hợp chất malloapelta C-H từ loài bùm bụp *Mallotus apelta*

Mẫu lá loài bùm bụp *Mallotus apelta* nghiền thành bột (4,0 kg) được chiết siêu âm 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần tối thiểu 60 phút, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô trong rượu metylic, được ký hiệu là dịch cô MA (568 g). Dịch cô MA phân bố đều với nước cất rồi chiết với diclorometan, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích, dịch chiết diclorometan được tiến hành loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được dịch cô diclorometan, ký hiệu là dịch cô MA1;

Dịch cô MA1 (250 g) được tiến hành phân tách trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (Φ 12 cm, chiều dài cột nhồi 5 cm) (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ 100/1-0/1 thu được năm phân đoạn ký hiệu lần lượt từ MA1A (15,0 g), MA1B (23,0 g), MA1C (15,0 g), MA1D (25,0 g) và MA1E (10,0 g)

Hòa tan phân đoạn MA1B (15,0 g) vào hỗn hợp dung môi diclorometan/axeton với tỷ lệ 2/1 về thể tích và tiến hành phân tách trên sắc ký trên cột sắc ký (Φ 8 cm, chiều dài cột nhồi 40 cm) chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), tỷ lệ MA1B/silica gel = 1/2 về khối lượng), hệ dung môi rửa giải diclorometan/axeton (40/1, v/v), thu được bốn phân đoạn ký hiệu là MA1B1 (1,0 g), MA1B2 (1,0 g), MA1B3 (1,2 g), and MA1B4 (1,3 g).

Hòa tan phân đoạn MA1B3 (1,2 g) vào hỗn hợp dung môi *n*-hexan/etyl acetat với tỷ lệ 4/1 về thể tích và tiến hành phân tách trên cột sắc ký (Φ 2 cm, chiều dài cột nhồi 45 cm) với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), tỷ lệ MA1B3/silica gel = 1/2 về khối lượng), hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/etyl acetat (4/1, v/v), thu được ba phân đoạn ký hiệu là MA1B3A đến MA1B3C. Phân đoạn MA1B3B (150 mg) được sắc ký trên cột pha đảo (Φ 1 cm, chiều dài cột nhồi 50 cm) (RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm, Fuji silysia Chemical Ltd.) thu được hợp chất malloapelta H (5,0 mg) có công thức (If) dưới dạng bột vô định hình.

Phân đoạn MA1D (25 g) được hòa tan bằng diclorometan và tiến hành phân tách trên cột sắc ký (Φ 8 cm, chiều dài cột nhồi 40 cm) với chất hấp phụ là silica gel (loại Kieselgel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ diclorometan trong axeton *n*-hexan/axeton tỷ lệ 40/1-5/1 thu được bốn phân đoạn ký hiệu là MA1D1 (2,5 g), MA1D2 (2,0 g), MA1D3 (1,8 g) và MA1D4 (1,7 g)

Phân đoạn MA1D1 (2,5 g) lên cột sắc ký (Φ 3 cm, chiều dài cột nhồi 40 cm) chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/2 về thể tích, tạo ra ba phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu MA1D1A (150 mg), MA1D1B (220 mg) và MA1D1C (180 mg). Phân đoạn MA1D1A được sắc ký trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 × 150 mm), dung môi axetonitril 30% trong nước, cho các hợp chất: malloapelta E (10,7 mg) có công thức (Ic) và malloapelta F (4,8 mg) có công thức (Id) dưới dạng bột vô định hình. Phân đoạn MA1D1B được sắc ký trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 × 150 mm), dung môi axetonitril 30% trong nước, thu được hợp chất malloapelta D (30,5) có công thức (Ib) dưới dạng bột vô định hình.

Phân đoạn MA1D3 (1,8 g) được đưa lên cột sắc ký (Φ 2,5 cm, chiều dài cột nhồi 45 cm), chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm, hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.) với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/2 về thể tích thu được hai phân đoạn, được ký hiệu MA1D3A và MA1D3B. Phân đoạn MA1D3A được sắc ký trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 × 150 mm), dung môi axetonitril 30% trong nước thu được hợp chất: malloapelta G (9,0 mg) có công thức (Ie). Phân đoạn MA1D3B được sắc ký trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 × 150 mm), dung môi axetonitril 40% trong nước thu được hợp chất: malloapelta C (41,5 mg) có công thức (Ia) dưới dạng bột vô định hình.

Hợp chất malloapelta C có công thức (Ia), tên thường gọi là malloapelta C.

- + Chất bột vô định hình màu trắng;
- + Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ 0,0° (*c* 0,1, CHCl₃);
- + Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại *m/z* 337,1646 [M+H]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức [C₁₈H₂₅O₆]⁺, 337,1646);
- + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 1. Số liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất malloapelta C (Ia) trong CDCl_3

C	δ_{C}	δ_{H} (mult., $J = \text{Hz}$)	C	δ_{C}	δ_{H} (mult., $J = \text{Hz}$)
2	77.6	-	11	24.2	1.32 (s)
3	70.5	3.74 (dd, 3.0, 8.5)	12	23.3	1.32 (s)
4	74.6	4.25 (d, 3.0)	1'	194.8	-
5	161.4	-	2'	134.3	6.29 (dq, 2.0, 16.0)
6	88.5	6.12 (s)	3'	145.2	6.58 (dq, 7.0, 16.0)
7	158.6	-	4'	18.1	1.87 (dd, 2.0, 7.0)
8	111.0	-	4-OMe	57.3	3.51 (s)
9	151.6	-	5-OMe	55.9	3.76 (s)
10	102.2	-	7-OMe	55.8	3.89 (s)
			3-OH		1.97 (d, 8.5)

Hợp chất malloapelta D có công thức (Ib), tên thường gọi là malloapelta D.

- + Chất bột vô định hình màu trắng;
- + Độ quay cực $[\alpha]_{\text{D}}^{22} 0,0^\circ$ (c 0,1, CHCl_3);
- + Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 323,1490 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_6]^+$, 323,1489);
- + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Số liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất malloapelta D (Ib) trong CDCl_3

C	δ_{C}	δ_{H} (mult., $J = \text{Hz}$)	C	δ_{C}	δ_{H} (mult., $J = \text{Hz}$)
2	78.5	-	11	25.5	1.37 (s)
3	75.0	3.71 (d, 6.5)	12	19.6	1.18 (s)
4	67.9	4.72 (d, 6.5)	1'	194.3	-
5	159.8	-	2'	134.1	6.29 (dq, 2.0, 16.0)
6	88.2	6.11 (s)	3'	145.1	6.57 (dq, 7.0, 16.0)
7	158.2	-	4'	18.2	1.88 (dd, 2.0, 7.0)
8	111.6	-	5-OMe	56.0	3.76 (s)
9	151.1	-	7-OMe	55.7	3.91 (s)
10	105.2	-			

Hợp chất malloapelta E có công thức (Ic), tên thường gọi là malloapelta E.

- + Chất bột vô định hình màu trắng;
- + Độ quay cực $[\alpha]_{\text{D}}^{22} 0,0^\circ$ (c 0,1, CHCl_3);
- + Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 323,1489 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_6]^+$, 323,1489);
- + Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Số liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất malloapelta E (Ic) trong CDCl_3

C	δ_C	δ_H (mult., $J = \text{Hz}$)	C	δ_C	δ_H (mult., $J = \text{Hz}$)
2	77.9	-	11	25.1	1.29 (s)
3	71.2	3.73 (dd, 5.5, 6.0)	12	21.4	1.32 (s)
4	62.2	4.94 (dd, 2.0, 5.5)	1'	194.3	-
5	160.2	-	2'	134.1	6.30 (dq, 2.0, 16.0)
6	87.9	6.11 (s)	3'	145.1	6.61 (dq, 7.0, 16.0)
7	158.4	-	4'	18.2	1.88 (dd, 2.0, 7.0)
8	111.6	-	5-OMe	56.0	3.77 (s)
9	151.6	-	7-OMe	55.7	3.91 (s)
10	104.4	-	3-OH		3.16 (d, 6.0)
			4-OH		3.45 (d, 2.0)

Hợp chất malloapelta F có công thức (Id), tên thường gọi là malloapelta F.

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ 0,0° (c 0,1, CHCl_3);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 321,1331 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_6]^+$, 321,1333);

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4. Số liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất malloapelta F (Id) trong CDCl_3

C	δ_C	δ_H (mult., $J = \text{Hz}$)	C	δ_C	δ_H (mult., $J = \text{Hz}$)
2	82.4	-	11	77.9	3.92 (d, 11.0)
3	69.8	4.10 (d, 5.0)			4.12 (d, 11.0)
4	69.5	5.16 (d, 5.0)	12	18.1	1.41 (s)
5	160.0	-	1'	193.7	-
6	88.6	6.09 (s)	2'	134.0	6.33 (dq, 2.0, 16.0)
7	159.3	-	3'	145.1	6.69 (dq, 7.0, 16.0)
8	110.3	-	4'	18.3	1.91 (dd, 2.0, 7.0)
9	152.9	-	5-OMe	56.0	3.78 (s)
10	102.9	-	7-OMe	55.7	3.84 (s)

Hợp chất malloapelta G có công thức (Ie), tên thường gọi là malloapelta G.

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ 0,0° (c 0,1, CHCl_3);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại m/z 323,1493 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tính toán lý thuyết cho công thức $[\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_6]^+$, 323,1489);

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5. Số liệu phổ ^1H - và ^{13}C -NMR của hợp chất malloapelta G (Ie) trong CDCl_3

C	δ_C	δ_H (mult., $J = \text{Hz}$)	C	δ_C	δ_H (mult., $J = \text{Hz}$)
---	------------	--------------------------------------	---	------------	--------------------------------------

2	78.5	-	11	25.9	1.26 (s)
3	75.6	3.76 (d, 7.0)	12	19.5	1.26 (s)
4	67.9	4.73 (d, 7.0)	1'	194.2	-
5	157.4	-	2'	134.0	6.39 (dq, 2.0, 16.0)
6	116.0	-	3'	146.4	6.70 (dq, 7.0, 16.0)
7	158.4	-	4'	18.4	1.92 (dd, 2.0, 7.0)
8	96.2	6.19 (s)	5-OMe	62.4	3.76 (s)
9	154.7	-	7-OMe	55.9	3.72 (s)
10	109.1	-			

Hợp chất malloapelta H có công thức (If), tên thường gọi là malloapelta H.

+ Chất bột vô định hình màu trắng;

+ Độ quay cực $[\alpha]_D^{22}$ 0,0° (*c* 0,1, CHCl₃);

+ Phổ khối lượng phân giải cao HRMS-ESI tại *m/z* 293,1403 [M+H]⁺, tính toán lý thuyết cho công thức [C₁₆H₂₁O₅]⁺, 293,1384;

+ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đưa ra trong Bảng 1 dưới đây.

Bảng 6. Số liệu phổ ¹H- và ¹³C-NMR của hợp chất malloapelta H (If) trong CDCl₃

C	δ _C	δ _H (mult., <i>J</i> = Hz)	C	δ _C	δ _H (mult., <i>J</i> = Hz)
2	78.3	-	11	28.4	1.44 (s)
3	125.5	5.46 (d, 10.0)	12	28.4	1.44 (s)
4	115.9	6.65 (d, 10.0)	1'	205.1	-
5	161.9	-	2'	52.3	3.04 (dd, 9.5, 18.0) 3.18 (dd, 2.5, 18.0)
6	105.7	-	3'	64.2	4.34 (ddq, 2.5, 6.5, 9.5)
7	163.0	-	4'	22.5	1.26 (d, 6.5)
8	91.4	5.88 (s)	7-OMe	55.6	3.86 (s)
9	160.5	-			
10	102.9	-			

Ví dụ 2: Thử nghiệm về tác dụng dược lý của các hợp chất malloapelta

Các hợp chất malloapelta theo sáng chế được thử nghiệm về hoạt gây độc tế bào ung thư buồng trứng như sau:

Hoạt tính gây độc tế bào ung thư được đánh giá theo phép thử WST-8. Đây là phương pháp đánh giá khả năng sống sót của tế bào ung thư thông qua khả năng khử (2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H tetrazolium, monosodium salt) (WST-8) thành phức hợp WST-8 formazan. Xác định phức màu trong mẫu thử sử dụng thiết bị đo mật độ quang tại bước sóng 450 nm.

Các tế bào ung thư được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 có bổ sung 10% FBS, 100 U/mL penicillin và 100 µg/mL streptomycin trong điều kiện 37°C và CO₂ 5%. Thí nghiệm được tiến hành như sau: các tế bào ung thư người ($1,5 \times 10^3$ tế bào/mL) được xử lý với các hợp chất ở nồng độ 100 µg/mL; 20 µg/mL; 4 µg/mL; 0,8 µg/mL cũng như chất đối chứng dương Carboplatin trong 3 ngày. Sau thời gian ủ, 12 µL WST-8 được thêm vào mỗi giếng và ủ trong 3 giờ cuối ở 37°C và đo bước sóng 540 nm sử dụng máy đọc microplate đa tính năng (Teckan, Maennedorf, Switzerland). Nồng độ các chất ức chế 50% sự phát triển tế bào gọi là GI₅₀; ức chế 50% tế bào sống sót gọi là IC₅₀. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và tính toán giá trị trung bình.

Kết quả được biểu thị trên Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7: Tác dụng gây độc tế bào ung thư buồng trứng TOV-21G của các hợp chất malloapelta C-H (Ia-If).

Hợp chất	GI ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM)
Malloapelta C (Ia)	3.04±0.12	3,04±0,12
Malloapelta D (Ib)	0.77±0.09	1,62±0,24
Malloapelta E (Ic)	2.64±0.02	2,64±0,02
Malloapelta F (Id)	2.48±0.67	4,02±0,51
Malloapelta G (Ie)	3.55±0.02	3,54±0,02
Malloapelta H (If)	10.39±0.09	10,42±0,07
Carboplatin	1.14±0.05	1,15±0,03

Hợp chất malloapelta C (Ia), malloapelta D (Ib), malloapelta E (Ic), malloapelta F (Id), malloapelta G (Ie) thể hiện tác dụng ức chế sự phát triển và sống sót tế bào ung thư với GI₅₀ trong khoảng 0,77-10,39 µM và IC₅₀ trong khoảng 1,62-10,42 µM, mạnh tương đương chất đối chứng dương carboplatin với GI₅₀ và IC₅₀ lần lượt là 1,14±0,05 và 1,15±0,03 µM. Kết quả này có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao, tạo cơ sở để nghiên cứu phát triển các dược phẩm mới có tác dụng điều trị bệnh ung thư từ loài bùm bực.

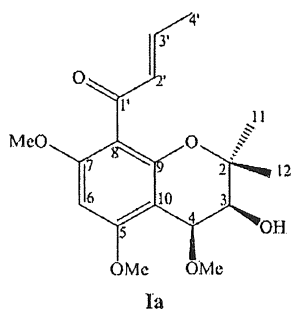
Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế đề cập đến các hợp chất mới, malloapelta C-H, và phương pháp phân lập các hợp chất từ loài bùm bực *Mallotus apelta*. Tất cả các hợp chất theo sáng chế đã được đánh giá tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư buồng trứng TOV-21G. Các hợp chất malloapelta thể hiện hoạt tính ức chế sự phát triển tế bào ung thư TOV-21G mạnh giá trị IC₅₀ nằm trong khoảng từ 1,62 đến 10,42 µM. Sáng chế này tạo cơ sở khoa

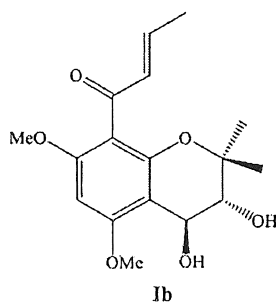
học vững chắc cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo nhằm tạo ra các dược phẩm có tác dụng phòng và điều trị bệnh ung thư dựa trên việc khai thác nguồn dược liệu quý, sẵn có trong nước.

Yêu cầu bảo hộ

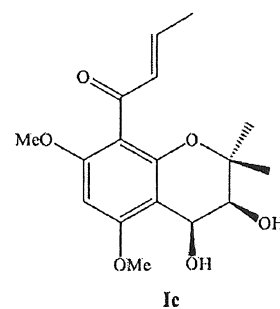
1. Hợp chất malloapelta C-H có công thức (Ia) đến (If) sau đây:



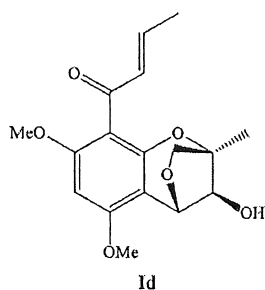
(malloapelta C)



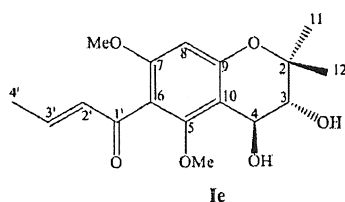
(malloapelta D)



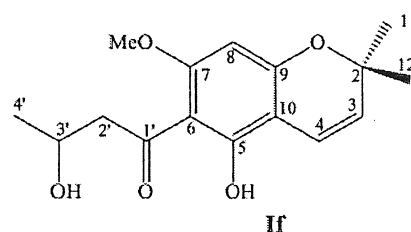
(malloapelta E)



(malloapelta F)



(malloapelta G)



(malloapelta H)

- Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là (3*S**,4*S**)-8-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-4,5,7-trimethoxy-2,2-dimethylchroman-3-ol (malloapelta C).
- Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là (3*R**,4*S**)-8-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-5,7-dimethoxy-2,2-dimethylchroman-3,4-diol (malloapelta D).
- Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là (3*S**,4*S**)-8-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-5,7-dimethoxy-2,2-dimethylchroman-3,4-diol (malloapelta E).
- Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là (2*S**,3*S**,4*S**)-8-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-5,7-dimethoxy-4,11-epoxy-2,2-dimethylchroman-3-ol (malloapelta F).
- Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là (3*R**,4*S**)-6-[1-oxobut-2(*E*)-enyl]-5,7-dimethoxy-2,2-dimethylchroman-3,4-diol (malloapelta G).
- Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là 6-(1-oxo-3-hydroxybutyl)-7-methoxy-2,2-dimethyl-2*H*-chromen-5-ol (malloapelta H).
- Phương pháp tách chiết các hợp chất malloapelta C-H theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 từ loài bùm búp *Mallotus apelta*, phương pháp này bao gồm các bước:

- (i) thu gom, thái nhỏ, phơi khô, nghiền thành bột mẫu lá loài bùm bụp *Mallotus apelta*, sau đó chiết siêu âm bột này 3 lần với rượu metylic ở nhiệt độ 50°C, mỗi lần tối thiểu 60 phút;
- (ii) gộp các dịch chiết trong rượu metylic thu được ở bước (i) lại, lọc qua giấy lọc và cất để loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được dịch cô trong rượu metylic, được ký hiệu là dịch cô MA;
- (iii) phân bố đều dịch cô MA với nước cất rồi chiết phân bố với diclometan, mỗi dung môi tiến hành chiết 2 lần với tỷ lệ 1/1 về thể tích (v/v), sau đó tiến hành loại bỏ dung môi của dịch chiết diclorometan dưới áp suất giảm thu được dịch cô diclorometan, được ký hiệu là dịch cô MA1;
- (iv) tiến hành phân tách dịch cô MA1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ axeton trong *n*-hexan là *n*-hexan/axeton tỷ lệ 100/1 đến 0/1 thu được năm phân đoạn, được ký hiệu lần lượt là MA1A đến MA1E;
- (v) hòa tan phân đoạn MA1B vào hỗn hợp dung môi diclorometan/axeton với tỷ lệ 2/1 về thể tích và tiến hành phân tách trên sắc ký trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), tỷ lệ MA1B/silica gel là 1/2 về khối lượng, hệ dung môi rửa giải diclorometan/axeton (40/1, v/v), thu được bốn phân đoạn, được ký hiệu là MA1B1 đến MA1B4;
- (vi) hòa tan phân đoạn MA1B3 vào hỗn hợp dung môi *n*-hexan/etyl axetat với tỷ lệ 4/1 về thể tích và tiến hành phân tách trên cột sắc ký ái lực với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck), tỷ lệ MA1B3/silica gel là 1/2 về khối lượng), hệ dung môi rửa giải *n*-hexan/etyl acetat (4/1, v/v), thu được ba phân đoạn, được ký hiệu là MA1B3A đến MA1B3C;
- (vii) tách các hợp chất malloapelta C-H, trong đó:
- tiến hành sắc ký phân đoạn MA1B3B trên cột pha đảo (RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , Fuji silysia Chemical Ltd.) thu được hợp chất malloapelta H có công thức (If) dưới dạng bột vô định hình;
 - hòa tan phân đoạn MA1D bằng diclorometan và tiến hành phân tách trên cột sắc ký với chất hấp phụ là silica gel (loại Kiesegel 60, cỡ hạt 230-400 mesh, hãng sản xuất Merck) với hỗn hợp dung môi rửa giải tăng dần nồng độ diclorometan trong axeton *n*-

hexan/axeton tỷ lệ 40/1-5/1 thu được bốn phân đoạn ký hiệu lần lượt từ MA1D1 đến MA1D4;

tiếp tục tiến hành sắc ký phân đoạn MA1D1 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.), với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/2 về thể tích, tạo ra ba phân đoạn nhỏ hơn, được ký hiệu từ MA1D1A-MA1D1C.

tiến hành sắc ký phân đoạn MA1D1A trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 $\times$ 150 mm), dung môi axetonitril 30% trong nước, cho các hợp chất malloapelta E có công thức (Ic) và malloapelta F có công thức (Id) dưới dạng bột vô định hình;

tiến hành chạy sắc ký phân đoạn MA1D1B trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 $\times$ 150 mm), dung môi axetonitril 30% trong nước, cho các hợp chất malloapelta D có công thức (Ib) dưới dạng bột vô định hình;

(ix) tiến hành sắc ký phân đoạn MA1D3 trên cột sắc ký với chất hấp phụ là pha đảo (loại RP-18, cỡ hạt 30 - 50 μm , hãng sản xuất Fuji silysia Chemical Ltd.) với hỗn hợp dung môi rửa giải axeton/nước cất tỷ lệ 1/2 về thể tích, tạo ra hai phân đoạn, được ký hiệu MA1D3A và MA1D3B;

tiếp tục tiến hành sắc ký phân đoạn MA1D3A trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 $\times$ 150 mm), dung môi axetonitril 30% trong nước thu được hợp chất malloapelta G có công thức (Ie);

tiếp tục tiến hành sắc ký phân đoạn MA1D3B trên hệ thống HPLC, cột J'sphere H-80 (20 $\times$ 150 mm), dung môi axetonitril 40% trong nước thu được hợp chất malloapelta C có công thức (Ia) dưới dạng bột vô định hình.