



Original Article

The Inhibitory Activity of Compounds from *Sophora japonica* L. on Amyloid Beta Formation in Alzheimer's Disease

Nguyen Quang Huy*, Do Thi Hai Anh

VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

Received 01 April 2020

Revised 10 June 2020; Accepted 11 June 2020

Abstract: Two compounds (C2 and C6) were isolated and purified from *Sophora japonica* L. extract. Using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, mass spectroscopy and thin layer chromatography, C2 and C6 were identified as quercetin and neohesperidin. The antioxidant activity of C2 and C6 (at concentration of 200 μ M) is equivalent to vitamin C (at concentration of 0.57-1.14 μ M/ml). Both compounds C2 and C6 have inhibitory activity on β -amyloid aggregation. At concentration of 1 mM of each compound, aggregation rate of β -amyloid (Amyloid form deposited in Alzheimer's brain) are 51.14 and 80.57%, respectively, compar to control sample (89.64%).

Keywords: amyloid beta, *Sophora japonica*, quercetin, neohesperidin.

* Corresponding author.

Email address: nguyenquanghuy@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5049>

Khả năng ức chế β -amyloid gây bệnh Alzheimer bởi một số chất tách từ hoa hòe (*Sophora japonica* L.)

Nguyễn Quang Huy*, Đỗ Thị Hải Anh

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 01 tháng 4 năm 2020

Chỉnh sửa ngày 10 tháng 6 năm 2020; Chấp nhận đăng ngày 11 tháng 6 năm 2020

Tóm tắt: Từ dịch chiết methanol hoa hòe khô đã phân lập và tinh sạch được hai chất (C2 và C6). Kết quả đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ khối lượng và sắc ký bản mỏng, chất C2 và C6 được xác định là quercetin và neohesperidin. Chất C2 và C6 ở nồng độ 20 μ M thể hiện hoạt tính chống oxi hóa tương đương với vitamin C nồng độ từ 0,57 đến 1,14 μ M/ml. Với nồng độ 1 mM cả hai chất đều thể hiện hoạt tính ức chế sự tích tụ peptide β -amyloid (dạng amyloid lắng đọng trong não bệnh nhân Alzheimer) với tỉ lệ tích tụ tương ứng 51,14 và 80,57% trong khi mẫu đối chứng là 89,64%.

Từ khóa: hoa hòe *Sophora japonica*, quercetin, neohesperidin, β -am.

1. Mở đầu

Bệnh Alzheimer là một bệnh thoái hóa thần kinh, biểu hiện qua việc giảm trí nhớ, rối loạn nhận thức, kèm theo các thay đổi về hành vi gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến hoạt động nghề nghiệp và xã hội của bệnh nhân. Bệnh Alzheimer được coi như một dạng thoái hóa amyloid – kết quả của quá trình biến đổi bất thường của protein tiền thân amyloid (APP), một protein xuyên màng. Dạng amyloid lắng đọng trong não bệnh nhân Alzheimer là β -amyloid ($A\beta$), một peptid gồm 39-43 axit amin [1]. $A\beta$ có tính chất gây độc ở mức độ *in vitro* và *in vivo* [2]. Các peptid $A\beta$ cũng có thể là nguyên nhân dẫn tới trường hợp mắc bệnh Alzheimer thể muộn [3].

Cây hoa hòe (*Sophora japonica* L.) là cây được trồng phổ biến ở Việt Nam. Cây vừa cho bóng mát, vừa cung cấp các giá trị khác đặc biệt về kinh tế và y học. Hoa hòe là một vị thuốc được sử dụng trong các bài thuốc dân tộc ở Việt Nam, Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc. Các thành

phần của cây như quả, hoa và chồi có giá trị lớn trong y học cổ truyền được sử dụng làm thuốc cầm máu cho các bệnh đổ máu cam, ho và tiểu tiện ra máu ở dạng thuốc sắc. Các nghiên cứu gần đây cho thấy thành phần flavonoids trong hoa hòe có hoạt tính chống oxi hóa, kháng viêm, kháng khuẩn, đặc biệt là khả năng giảm sự tích lũy peptide β -amyloid, peptide gây bệnh Alzheimer [4]. Bài báo này trình bày kết quả tách chiết và tác dụng sinh học của một số hợp chất flavonoids từ hoa hòe.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu: Hoa hòe khô (*Sophora japonica* L.) được mua tại Nhật.

Hoá chất: Amyloid 1-42 và thuốc nhuộm peptide Thioflavin T của Sigma-Aldrich, Mỹ. Các chất chuẩn Quercetin, Rutin, Neohesperidin của WAKO, Nhật Bản. Các loại hóa chất, dung môi được sử dụng cho tách chiết như n-hexane,

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: nguyenquanghuy@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5049>

ethyl acetate, ethanol, methanol, axit acetic của hãng WAKO, Nhật Bản đảm bảo cho phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Hoạt tính chống oxi hóa được tiến hành theo phương pháp diệt gốc tự do 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) [5]. DPPH có khả năng tạo các gốc tự do bền trong dung dịch ethanol bão hoà. Khi cho các chất thử nghiệm vào hỗn hợp, nếu chất có khả năng làm trung hoà hoặc bao vây các gốc tự do sẽ làm giảm cường độ hấp phụ ánh sáng. Hoạt tính chống oxi hoá được đánh giá qua giá trị hấp phụ ánh sáng của dịch thử nghiệm với đối chứng ở bước sóng 515 nm. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH được tính bằng công thức:

$$\% \text{ Hoạt động} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{mẫu thử nghiệm}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

Trong đó: A_{control} : giá trị độ hấp thụ của mẫu chuẩn; $A_{\text{mẫu thử nghiệm}}$: giá trị độ hấp thụ của mẫu thử nghiệm

Phương pháp đánh giá huỳnh quang: Sử dụng Thioflavin T (ThT) làm thuốc nhuộm để quan sát và định lượng việc hình thành β -amyloid bằng kính hiển vi huỳnh quang. Mật độ huỳnh quang của dung dịch được đo ở bước sóng kích thích 390 nm, bước sóng phát quang 535 nm [6]. Khả năng ngăn chặn sự tích tụ β -amyloid được đánh giá bằng công thức:

$$\text{Khả năng ngăn chặn (\%)} = 100 - 100 \times \frac{S_1 - S_0}{T_1 - T_0}$$

Trong đó: S_1 : giá trị huỳnh quang của mẫu khi có mặt ThT; S_0 : giá trị huỳnh quang của mẫu khi không có mặt ThT; T_1 : giá trị huỳnh quang của đối chứng âm khi có mặt ThT; T_0 : giá trị huỳnh quang của đối chứng âm khi không có mặt ThT.

Sắc ký cột pha thường (CC) sử dụng Silica gel cỡ hạt 0,040 – 0,063 mm và 0,063 – 0,200 mm; Sắc ký cột pha đảo RP-18. Sắc ký lớp mỏng (TLC) được thực hiện trên bản silicagel trắng sẵn DC-Alufolien 60 F₂₅₄ (Merck, Đức). Hiện thị chất trên TLC bằng thuốc thử vanilin và AlCl₃, quan sát ở bước sóng 365 nm.

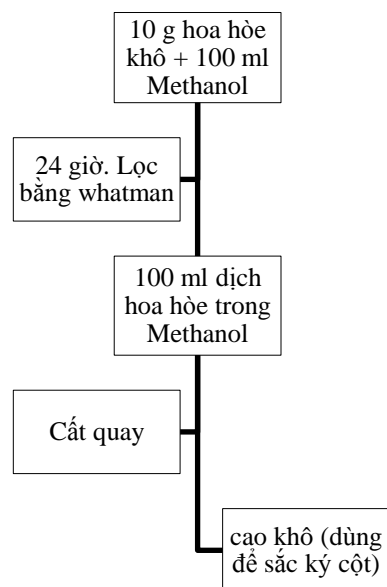
Phổ khối lượng (ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): ¹H-NMR (500 MHz) và ¹³C-NMR (125 MHz) được thực hiện tại Trường Đại học tổng hợp Hiroshima, Nhật Bản.

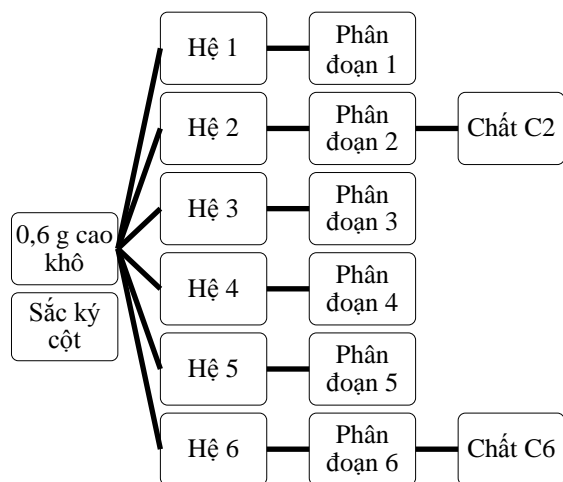
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tách chiết hợp chất trong dịch chiết methanol của hoa hòe

Hoa hòe khô được ngâm trong methanol với tỉ lệ 1:10 (w/v) ở 24 giờ. Lọc thu dịch chiết bằng giấy Whatman. Cô quay dịch chiết methanol hoa hòe khô ở nhiệt độ 70°C, tốc độ quay 400 vòng/phút, thu được cao chiết. Làm khô cao chiết bằng khí N₂ lỏng. Cao khô được bảo quản ở 4°C.

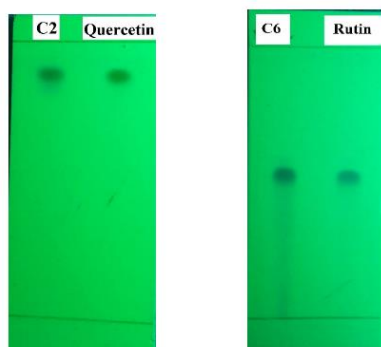
0,6 g cao methanol khô hoa hòe được chạy sắc ký cột với 6 hệ dung môi có độ phân cực tăng dần với thể tích 200 ml mỗi hệ. Hệ 1: (n-hexane/ethyl acetate với tỉ lệ 5/5), Hệ 2: (n-hexane/ethyl acetate với tỉ lệ 2/8), Hệ 3: (ethyl acetate 100%), Hệ 4: (ethyl acetate/ethanol với tỉ lệ 5/5), Hệ 5: (ethanol 100%), Hệ 6: (ethanol/nước với tỉ lệ 8/2). Quá trình tách chiết các chất trong cao hoa hòe được trình bày trong Hình 1.





Hình 1. Sơ đồ quá trình tách chiết các chất trong hoa hòe.

Sau sắc ký cột, dịch mẫu được cô quay thu hồi dung môi thu 6 phân đoạn khác nhau. Tuy nhiên các phân đoạn 1, 3, 4 và 5 không thu được các chất dưới dạng bột, hàm lượng thấp (kết quả không trình bày) nên không nghiên cứu tiếp. Từ 0,6 g cao methanol hoa hòe khô đã thu được chất C2 với khối lượng 40 ± 5 mg và chất C6 có khối lượng 260 ± 39 mg (Hình 1). Sử dụng sắc ký bản mỏng với hệ dung môi triển khai ethyl acetate/ethanol/axit acetic 25 mM với tỉ lệ 4:1:1 xác định chất C2 và C6 có giá trị R_f tương ứng 0,89 và 0,51 (Hình 2). Các giá trị R_f này tương ứng với quercetin và rutin là những chất phổ biến có hàm lượng cao trong hoa hòe [7]. Mặt khác qua kết quả sắc ký bản mỏng 2 chất C2 và C6 có độ sạch cao và được chúng tôi tiếp tục phân tích, xác định cấu trúc bằng sắc ký khối phổ.



Hình 2. Ảnh sắc ký bản mỏng chất C2 và C6 so sánh với quercetin và rutin chuẩn.

3.2. Xác định cấu trúc chất phân tách có trong dịch chiết hoa hòe

Chất C2 cho phản ứng màu với thuốc thử vanilin và $AlCl_3$ chứng tỏ chúng có cấu trúc khung của flavonoids. Các giá trị phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton ^1H-NMR của chất C2 so với chất quercetin cho thấy có sự tương đồng cao với sự xuất hiện của proton hydroxyl, proton nhân thơm và proton từ dung môi (Bảng 1). Kết hợp với giá trị R_f trong kết quả chạy sắc ký bản mỏng, chất C2 tương đồng với quercetin với công thức cấu tạo có trong Hình 3.

Bảng 1. Giá trị các đỉnh ^1H-NMR của chất C2 và quercetin chuẩn

STT	Quercetin	C2	STT	Quercetin	C2
1	11,613	12,441	16	6,003~6,000	5,971
2	9,928	9,911	17	5,536~5,531	5,529
3	8,729	N/A	18	5,316~5,309	5,279
4	8,482	N/A	19	N/A	3,828
5	N/A	7,672	20	N/A	3,484
6	N/A	7,54	21	N/A	2,729
7	N/A	7,536	22	2,497	2,49
8	N/A	6,933	23	N/A	2,141
9	6,800~6,794	6,899	24	N/A	1,975
10	6,676	6,881	25	1,626	1,62
11	6,673~6,652	6,863	26	N/A	1,452
12	N/A	6,452	27	N/A	1,177
13	N/A	6,394	28	N/A	0,889
14	N/A	6,39	29	N/A	0,817
15	6,019~6,018	6,173			

N/A: không tồn tại

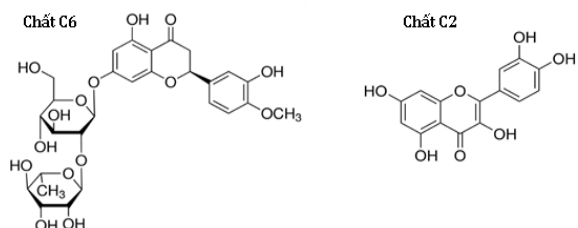
Chất C6 cũng cho phản ứng với thuốc thử vanilin và $AlCl_3$ cho thấy trong cấu trúc chất C6 tồn tại khung flavonoids. Sử dụng phương pháp đo phổ khối lượng và phổ cộng hưởng từ hạt nhân cho thấy chất C6 có khối lượng khoảng 610 và các tín hiệu chính thu được ở phổ ^1H-NMR và $^{13}C-NMR$ tương đồng với neohesperidin chất dẫn xuất từ rutin (Bảng 2).

Bảng 2. Giá trị các đỉnh của Neohesperidin chuẩn và chất C6

STT	1H-NMR		13C-NMR	
	Neohesperidin	C6	Neohesperidin	C6
1	12,011	N/A	197,711~197,558	N/A
2	9,091	9,19	N/A	177,375
3	N/A	8,880	N/A	173,703
4	N/A	8,767	N/A	171,518
5	6,841	6,815	165,385~165,280	166,778
6	N/A	6,32	163,458~163,125	161,541
7	6,090~6,060	6,113	N/A	157,106
8	5,294~5,086	5,258	N/A	156,925
9	4,703~4,557	4,362	148,569	149,437
10	N/A	4,004	147,014	145,546
11	N/A	3,975	131,419~131,343	133,632
12	3,744	3,79	N/A	127,27
13	3,649	3,682	N/A	121,423
14	N/A	3,167	118,476~118,361	116,73
15	N/A	3,492	114,737~112,543	115,881
16	3,425	3,475	103,873	103,596
17	3,407	3,409	100,963	102,499
18	3,346	3,344	100,925	101,984
19	N/A	3,325	N/A	101,24
20	3,29	3,259	97,949~97,835	99,896
21	N/A	3,218	96,805~95,708	94,525
22	N/A	3,194	N/A	84,262
23	N/A	3,057	79,225~78,958	76,974
24	N/A	3,006	77,671~77,732	76,316
25	2,761~2,708	2,987	76,717~76,612	74,599
26	2,474~2,467	2,473	72,358	68,762
27	N/A	2,27	71,003~70,116	67,522
28	N/A	2,248	68,819	67,131
29	N/A	1,944	60,969	60,33
30	1,142~1,130	1,143	N/A	57,402
31	1,041	1,114	56,219	55,637
32	1,027~1,012	1,129	N/A	53,768
33	N/A	0,932	N/A	45,746
34	N/A	0,806	42,684	42,579
35	N/A	0,712	N/A	N/A

N/A: không tồn tại

Các kết quả đo giá trị phổ khối lượng, phổ cộng hưởng từ và kết hợp với giá trị R_f trong sắc ký lớp mỏng cho thấy chất C6 là neohesperidin với cấu trúc hóa học được thể hiện trong Hình 3.



Hình 3. Cấu trúc hóa học của chất C2 (quercetin) và C6 (neohesperidin).

3.3. Khả năng chống oxy hóa và hình thành β -amyloid

Trong điều kiện thí nghiệm, khả năng bắt gốc tự do của các chất giảm đáng kể khi nồng độ các chất bị pha loãng 10 lần. So sánh với khả năng bắt gốc tự do của vitamin C, chất C2 và chất C6 tại nồng độ 20 μ M có hoạt tính tương đương với vitamin C nồng độ từ 0,57-1,14 μ M/ml. Còn tại nồng độ 200 μ M, các chất thử nghiệm có hoạt tính cao hơn vitamin C tại nồng độ 3,97 μ M/ml (Bảng 3). Khả năng bắt gốc tự do quercetin chuẩn cao hơn so với chất C2, thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh hơn ở cùng nồng độ, tại nồng độ 200 μ M là 91,3% so với 69,86%, và ở nồng độ 20 μ M là 9,57% so với 5,28%. Tương tự, khả năng chống oxy hóa của rutin chuẩn cao hơn so với chất C6, tuy nhiên sự khác biệt là không nhiều (Bảng 3).

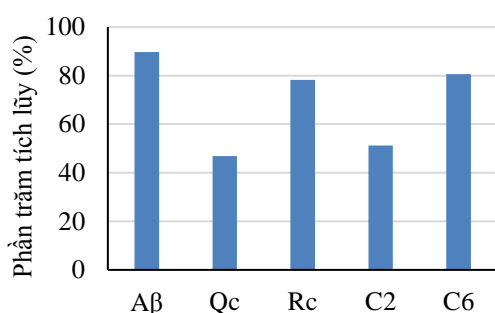
Bảng 3. Giá trị quét gốc tự do DPPH của các chất

	Nồng độ (μ M)	Khả năng bắt gốc tự do (%)
Quercetin chuẩn	200	91,3
	20	9,57
Chất C2	200	69,86
	20	5,28
Rutin chuẩn	200	91,44
	20	14,60
Chất C6	200	91,11
	20	11,81
Vitamin C	0,57	6
	1,14	20
	3,97	59

Các nghiên cứu cho thấy, tùy vào điều kiện thí nghiệm như môi trường đệm, độ pH, nồng độ DPPH, nồng độ chất thử nghiệm mà quercetin và

rutin thể hiện hoạt tính chống oxy hóa, quét gốc tự do DPPH khác nhau [8,9].

Sự tập hợp protein để tạo thành sợi amyloid là một đặc tính phổ biến trong các bệnh rối loạn ở con người như bệnh Alzheimer. Thioflavin T là một chất đánh dấu thường được sử dụng để theo dõi sự hình thành sợi amyloid *in vitro*. Khi gắn với các sợi amyloid, ThT cho tín hiệu huỳnh quang mạnh hơn. Dựa vào đặc tính này, chúng tôi đã thí nghiệm ghi nhận sự thay đổi tín hiệu huỳnh quang của Thioflavin T trong các mẫu thí nghiệm khác nhau. Sự thay đổi tín hiệu huỳnh quang được tính toán và thể hiện Hình 4.



Hình 4. Sự tích lũy β -amyloid khi bổ sung các chất thử nghiệm

A β : đối chứng, Qc: bổ sung quercetin, Rc: bổ sung rutin, C2: bổ sung chất C2, C6: bổ sung chất C6

Trong điều kiện không bổ sung các chất nghiên cứu, tỉ lệ tạo thành sợi của β -amyloid là 89,64%. Khi có mặt quercetin và rutin ở nồng độ 1,0 mM, tỉ lệ tạo thành sợi tương ứng là 46,86% và 78,21%. Chất C2 với nồng độ 1,0 mM có khả năng ức chế tạo sợi tốt hơn rutin nhưng kém hơn quercetin với tỉ lệ tạo sợi của β -amyloid là 51,14%. Chất C6 với nồng độ 1 mM có khả năng ức chế kém hơn chất C2, khả năng tạo sợi của β -amyloid khi có mặt chất C6 là 80,87% (Hình 4).

Nghiên cứu của See-Lok Ho và cộng sự, với sự xuất hiện của quercetin và neohesperidin ở nồng độ 200 μ M làm giảm đáng kể sự hình thành sợi peptide β -amyloid. Trong môi trường có mặt neohesperidin hoặc quercetin, các monomer β -amyloid tồn tại trong thời gian dài hơn trước khi tạo thành oligomer và tạo sợi peptide so với trong môi trường đối chứng đệm phosphate [10].

Karim và cộng sự cũng đã chứng minh quercetin và rutin ngăn cản sự tạo thành sợi và tích tụ của β -amyloid *in vitro* thông qua mô hình tế bào [11]. Dubey và Chinnathambi đã tách chiết được các hợp chất Bacoside A, B, Bacosaponin... từ cây Brahmi có hoạt tính chống oxy hóa, ức chế tập hợp β -amyloid giúp cải thiện hành vi và nhận thức [12].

4. Kết luận

- Đã tinh sạch được hai chất C2 và C6 từ dịch chiết methanol của hoa hòe. Chất C2 được xác định là quercetin và chất C6 là neohesperidin. Hai chất C2 và C6 ở nồng độ 20 μ M thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tương đương với vitamin C ở nồng độ từ 0,57 đến 1,14 μ M/ml.

- Hai chất C2 và C6 tại nồng độ 1 mM có hoạt tính chống lại sự tích tụ peptide β -amyloid với tỉ lệ tương ứng 51,14% và 80,57%.

Lời cảm ơn

GS. Shunsuke Izumi và PGS. Kazumi Saisuka, Khoa Toán học & Khoa học sự sống, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Tổng hợp Hiroshima, Nhật Bản đã tạo điều kiện cho nghiên cứu.

Công trình được hỗ trợ kinh phí bởi quỹ học bổng PEACE của Đại học Tổng hợp Hiroshima, Nhật Bản và Nhiệm vụ Địa chí Quốc gia tập Động vật - Thực vật mã số NVQC 19-09.

Tài liệu tham khảo

- [1] X. Cao, T.C. Südhof, A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60, *Science* 293 (2001) 115-120. <https://doi.org/10.1126/science.1058783>.
- [2] C. Guela, C.K. Wu, D. Saroff, A. Lorenzo, M. Yuan, B.A. Yankner, Aging renders the brain vulnerable to amyloid β -protein neurotoxicity, *Nat. Med.* 4 (1998) 827-831. <https://doi.org/10.1038/nm0798-827>.
- [3] N. Iwata, S. Tsubuki, Y. Takaki, K. Shirogami, B. Lu, N. P. Gerard, C. Gerard, E. Hama, H. Lee, T. C. Saido, Metabolic regulation of brain abeta by

- nepilysin, *Science* 292 (2011) 1550-1552. <https://doi.org/10.1126/science.1059946>.
- [4] C. Cheignon, M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Fallerf, C. Hureau, F. Collin, Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease, *Redox Biol.* 14 (2018) 450-464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>.
- [5] V. Katalinic, M. Milos, T. Kulisic, M. Jukic, Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols, *Food Chem.* 94 (2006) 550-557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004>.
- [6] P. Thang, Alzheimer's disease and other forms of dementia (in Vietnamese), Medical publishing, Hanoi, 2010.
- [7] X. He, Y. Bai, Z. Zhao, X. Wang, J. Fang, L. Huang, M. Zeng, Q. Zhang, Y. Zhang, X. Zheng, Local and traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Sophora japonica* L.: A review, *J. Ethnopharmacol.*, 187 (2016) 160-182. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.014>.
- [8] O. Senay, K.K. Ozgur, S. Zeliha, Antioxidant activity of quercetin: A mechanistic review, *Turkish Journal of Agriculture: Food Science and Technology*, 4 (2016) 1134-1138. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v4i12.1134-1138.1069>.
- [9] M. Zhang, S.G. Swarts, L. Yin, C. Liu, Y. Tian, Y. Cao, M. Swarts, S. Yang, S. Zhang, K. Zhang, S. Ju, D.J. Olek, L. Schwart, P.C. Keng, Rob. Howell, L. Zhang, P. Okunieff, Antioxidant properties of quercetin, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer, Boston, MA, (2011) pp. 283-289. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7756-4_38.
- [10] S.L. Ho, C.Y. Poon, C. Lin, T. Yan, D. Wai-Jing Kwong, K. Kin-Lam Yung, H.W. Li, Inhibition of β -amyloid aggregation by albiflorin, aloemodin and neohesperidin and their neuroprotective effect on primary hippocampal cells against β -amyloid induced toxicity, *Curr. Alzheimer Res.* 12 (2015) 424-433. <https://doi.org/10.2174/1567205012666150504144919>.
- [11] J. Karim, B. Paloma, B. Juana, M. Sagrario, Quercetin and rutin exhibit anti-amyloidogenic and fibril-disaggregating effects *in vitro* and potent antioxidant activity in APPswe cells, *Life Sci.* 89 (2011) 939-945. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.09.023>.
- [12] T. Dubey, S. Chinnathambi, Brahmi (*Bacopa Monnieri*): An ayurvedic herb against the Alzheimer's disease, *Arch. Biochem. Biophys.* 856 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108153>.