

© Коллектив авторов, 2012

М. В. Гаврилин, А. В. Съедин, С. П. Сенченко

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЩЕСТВ АНТИКАНЦЕРОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ В НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *BRASSICACEAE*

Пятигорская государственная фармацевтическая академия, Пятигорск, Россия

Методом мицеллярной электрокинетической хроматографии установлено содержание индол-3-карбинола в надземной части некоторых растений семейства крестоцветные. Установлено, что высоким содержанием индол-3-карбинола, от 1,4 до 1,9 % отличается трава *Brassica napus* L. (рапс) и листья *Brassica rapa* L. (репа). В связи с перспективностью *Brassica napus* L. в качестве источника веществ, обладающих антиканцерогенным действием, методом обращённофазовой ВЭЖХ установлено значительное содержание флавоноидов, основными агликонами которых являются кверцетин, кемпферол и изорамнетин.

Ключевые слова: мицеллярная электрокинетическая хроматография, индол-3-карбинол, флавоноиды, *Brassicaceae*

В настоящее время для России характерна достаточно высокая заболеваемость различными формами онкологических заболеваний. Несмотря на широкое внедрение высокотехнологичных видов медицинской помощи, одним из путей решения этой проблемы может служить применение средств профилактики среди лиц, относящихся к группам риска.

К числу средств профилактики относят различные флавонолы (кверцетин, лютеолин, кемпферол, апигенин, др.), а также катехины и проантоцианидины, оказывающие антиоксидантное действие, и природные индолы, среди которых следует особо выделить индол-3-карбинол (I3C). На сегодня способность I3C его основного метаболита 3,3'-дииндоллилметана оказывать противоопухолевое действие доказана не только в лабораторных экспериментах, но и в клинике [1, 2]. Для I3C также подтверждена эффективность при раке предстательной и молочной желёз, раке желудка и толстого кишечника [3 – 5], установлено, что противоопухолевое действие реализуется за счёт стимуляции апоптотической гибели опухолевых клеток, блокирования деления трансформированных клеток, торможению пролиферативных сигналов, индуцированных цитокинами и полипептидными ростовыми факторами, причём как на рецепторном уровне, так и на уровне цитоплазматических сигнальных киназ [6]. Благодаря такому выраженному действию I3C, в нашей стране это соединение отнесено к числу незаменимых пищевых веществ и установлена обязательная суточная норма потребления с пищей I3C в количестве 50 мкг/сутки (Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп

населения Российской Федерации. Методические рекомендации, МР 2.3.1.2432-08).

В качестве природного источника I3C рекомендуется капуста брокколи, однако ввиду высокой себестоимости культивирования этого растения целесообразным является поиск других растений, содержащих как I3C, так и значительное количество флавоноидов. В связи с этим целью настоящей работы стало количественное определение I3C в различных растениях семейства *Brassicaceae*.

Несмотря на широкое распространение этих растений в культуре, в фитохимическом отношении род *Brassica* остаётся недостаточно изученным. В [7] приведены сведения о флавоноидном составе семян рапса. Указано на присутствие сложных эфиров кемпферола и синаповой кислоты. Следует отметить, что и для цветков *Brassica rapa* L. характерно накопление гликозидов изорамнетина, в частности 3,7-О-β-глюкозида [8], для *Brassica oleracea* L. характерно накопление не только 3,7-О-β-глюкозида изорамнетина, но и 3,7-О-β-глюкозида кемпферола, а также 3-О-β-софорозид-7-О-β-глюкозида кемпферола [9]. В то же время для *Brassica carinata* L. характерно накопление дигидрокверцетина и дигидрокемпферола [10], также установлено, что за синтез этих флавоноидов ответственны соответствующие NADP-зависимые ферменты [11].

Экспериментальная часть

В работе использовали надземную часть капусты брокколи (*Brassica oleracea* L.), капусты полевой, син. репа (*Brassica rapa* L.), горчицы полевой (*Sinapis arvensis* L.) и капусты масличной, син. рапс (*Brassica napus* L.). В качестве стандартных образцов использо-

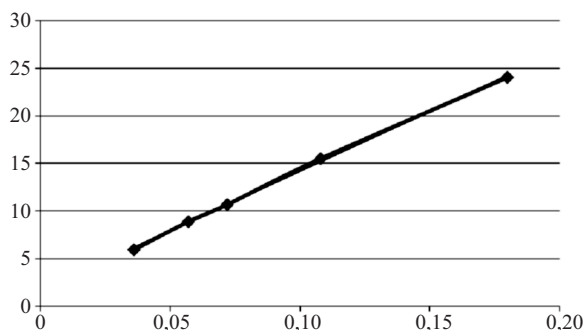


Рис. 1. Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации раствора индол-3-карбинола, по оси ординат — площадь пика, по оси абсцисс — концентрация стандартного раствора индол-3-карбинола, г/100 мл.

вали I3C, кемпферол, кверцетин и изорамнетин фирмы Fluka.

Для количественного определения I3C был использован метод капиллярного электрофореза. Работу проводили на приборе “Капель 103Р” (ОАО “НПФ Люм-экс”, Россия) с кварцевым капилляром диаметром 50 мкм, общей длиной 75 см и эффективной длиной 65 см. Для подготовки капилляра и восстановления его поверхности проводили его последовательную промывку водой, 1 М раствором натрия гидроксида, водой, 1 М раствором кислоты хлороводородной, водой и затем ведущим электролитом. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при 254 нм в катодной области капилляра. Работу проводили при комнатной температуре. В качестве ведущего электролита использовали раствор натрия тетрабората (10 мг/мл), ввод пробы осуществляли давлением — 150 мБар · с. Перед введением, пробы извлечения из сырья центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. Анализ проводили под напряжением в 25 кВ.

Предварительно изучали электрофоретическую подвижность стандартного образца I3C. Для этого использовали свежеприготовленные растворы I3C в диметилформамиде. При этом установлено, что в данных условиях пик I3C фиксируется на электрофореграмме сразу после системного пика. Такую высокую электрофоретическую подвижность можно объяснить

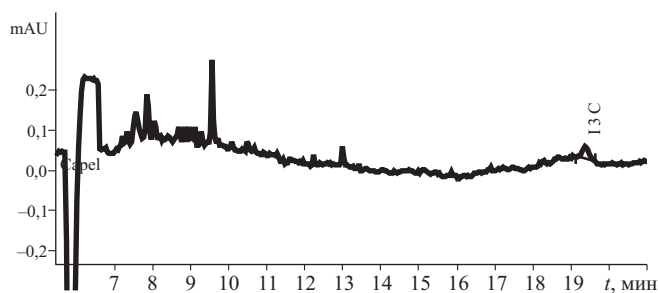


Рис. 2. Электрофореграмма извлечения из травы рапса обыкновенного.

отсутствием ионизации I3C в среде боратного электролита, что позволяет использовать режим мицеллярной электрокинетической хроматографии. В качестве оптимальных условий выбраны следующие: концентрация натрия тетрабората декагидрата 10 мг/мл, натрия додецилсульфата 10 мг/мл, напряжение 25 кВ. В этих условиях линейная зависимость площади пика от концентрации находится в интервале 0,03 – 0,2 г/100 мл и выражается уравнением $y = 124,8x + 1,8$ с коэффициентом корреляции $r = 0,996$ (рис. 1).

Для определения содержания I3C в сырье предварительно установлено, что оптимальной является экстракция при кипячении навески сырья (около 0,5 г), измельченного до частиц размером не более 3 мм, 50 мл смеси диметилформамида и спирта этилового 4:1, в течение 1 ч. После чего извлечение охлаждали, фильтровали и доводили в мерной колбе до объема в 50 мл. Полученный раствор после центрифугирования использовали для анализа. При этом установлено, что в надземной части брокколи, рапса и листьях репы присутствует в свободном виде I3C, в траве горчицы полевой обнаруживаются лишь следы, что косвенно подтверждает наше предположение о том, что I3C может быть признаком для рода *Brassica* (рис. 2). Полученные результаты количественного содержания I3C в пересчете на сухое сырьё представлены в табл. 1.

Как следует из представленных данных, максимальное количество I3C обнаруживается в траве рапса, что делает эту культуру, с учётом простоты культивирования, перспективной для дальнейшего изучения.

Таблица 1
Результаты количественного определения индол-3-карбинола в надземной части некоторых растений семейства Brassicaceae, n = 6

Объект исследования	Место и время сбора	Содержание I3C, %
<i>Brassica oleracea</i> L., брокколи	Растение, выращенное в условиях теплицы, 2009 г.	0,281 ± 0,019
<i>Brassica rapa</i> L., капуста полевая, репа	г. Пятигорск, культивируемое растение, 2010 г.	1,811 ± 0,0104
<i>Sinapis arvensis</i> L., горчица полевая	Ставропольский край, Кочубеевский район, дикорастущее растение 2009 г.	0,380 ± 0,0206
<i>Brassica napus</i> L., капуста масличная, рапс	Ставропольский край, Петровский район, культивируемое растение 2009 г.	1,149 ± 0,057
То же	Ставропольский край, Минераловодский район, культивируемое растение, 2010 г.	2,150 ± 0,0122
То же	Краснодарский край, Новокубанский район, культивируемое растение, 2009 г.	1,427 ± 0,104
То же	Краснодарский край, Новокубанский район, культивируемое растение, 2010 г.	1,966 ± 0,087

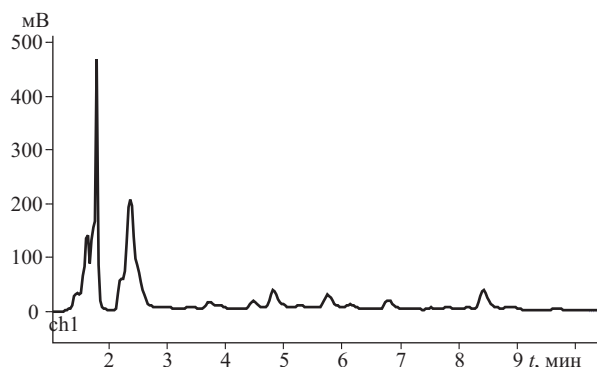


Рис. 3. Хроматограмма водной фракции извлечения из сырья.

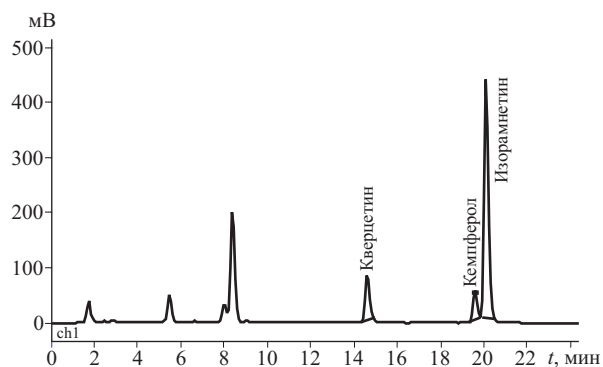


Рис. 4. Хроматограмма продуктов гидролиза извлечения из травы рапса обыкновенного.

Т а б л и ц а 2

Результаты количественного определения суммы агликонов в различных частях наземной части рапса обыкновенного, %, $n = 6$

Изученное сырьё (сбор 2009 г)	Стебли			Листья			Цветки		
	Изорамнетин	Кверцетин	Кемпферол	Изорамнетин	Кверцетин	Кемпферол	Изорамнетин	Кверцетин	Кемпферол
Новокубанский район Краснодарского края	0,144	0,102	0,014	0,309	0,09	0,037	0,326	0,359	0,346
Георгиевский район Ставропольского края	0,145	0,092	0,017	0,192	0,120	0,250	0,998	0,209	0,077
Петровский район Ставропольского края	0,143	0,136	0,032	0,227	0,152	0,307	1,117	0,257	0,075

Следующим этапом исследования стало изучение флавоноидов в надземной части рапса.

Для предварительной оценки содержания флавоноидов 3,5 г сырья в течение 2 ч экстрагировали в колбе с обратным холодильником спиртом этиловым 70 % [6]. Далее полученное извлечение упаривали при нагревании до остатка 30 – 40 мл и трижды промывали гексаном порциями по 30 мл для удаления различных гидрофобных соединений (липиды, воски и др.). Затем извлечение при помощи механического встряхивателя последовательно экстрагировали хлороформом, этилацетатом и бутанолом. Для каждой экстракции использовали 3 порции экстрагента по 30 мл. Время каждой экстракции составляло 10 мин. Далее все 4 извлечения — хлороформное, этилацетатное, бутанольное и водное — анализировали методом ВЭЖХ.

Исследование проводили с использованием системы для ВЭЖХ Стайер фирмы “Аквилон”, с колонкой Luna C 18 “Phenomenex, USA”, с содержанием углерода около 16 %. Размер колонки 150 × 4,6 мм. Ввод пробы осуществлялся с помощью петлевого дозатора. Объём пробы 20 мкл. Элюирование проводили в градиентном режиме. Элюент А — ацетонитрил, элюент В — 2 % раствор кислоты муравьиной. Содержание ацетонитрила увеличивалось от 20 до 60 % за 40 мин при расходе подвижной фазы 1 мл/мин. Детектирование осуществляли при 365 нм.

Установлено, что в хлороформной фракции из извлечения отсутствуют пики, детектируемые при 365 нм, что позволяет исключить значимое количество агликонов флавоноидов в сырье. В этилацетатной фракции присутствует только 1 пик, который по времени выхода в данных условиях элюирования и на основании имеющегося опыта может быть отнесён к гликозидам флавоноидов. Следует отметить, что в бутанольном извлечении площадь данного пика больше, что позволяет отнести его к бигликозидам. Однако основные по площади сигналы на хроматограмме присутствуют в водной фракции извлечения и элюируются в первые минуты хроматографирования (рис. 3). Это позволяет считать, что флавоноиды в надземной части находятся в высокогликозилированной форме, что обеспечивает данным молекулам высокую полярность и низкую сорбцию на обращённофазном сорбенте.

С целью выяснения природы этих соединений была предпринята попытка ВЭЖХ-изучения агликонов флавоноидов. Для этого проводили экстракцию сырья смесью спирта этилового 95 % и кислоты хлороводородной, разведённой 7:3, в течение 1 ч. После экстракции проводили ВЭЖХ-анализ при описанных выше условиях. Установлено, что для всех частей растения характерен одинаковый набор агликонов, но существуют различия в относительном содержании агликонов: кверцетина, кемпферола и изорамнетина (рис. 4).

Содержание каждого из флавоноидов в сырье вычисляли на основе предварительно установленных градуировочных зависимостей между площадями пиков и концентрациями растворов стандартных образцов. Полученные результаты количественного содержания агликонов в пересчёте на сухое сырьё представлены в табл. 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вестник Научно-исследовательского института молекулярной медицины, № 9, 49 – 56 (2009).
2. П. А. Апухтин, О. И. Анашкина, Д. Н. Сидорин, *Фармация*, № 5, 52 – 54, (2009).
3. K. I. Jeon, J. K. Rih, *Febs. Let.*, **544**, 246 – 251 (2003).
4. P. H. Jellinck, P. Gekforkert, *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 1129 – 1136 (1993).
5. F. Kassie, S. Kalscheuer, I. Matisse, *Carcinogen.*, **31**(2), 239 – 245 (2009).
6. A. Ahmad, W. A. Sakr, K. M. Rahman, *Cur. Drug Targets*, **11**(6), 652 – 666 (2010).
7. A. Baumert, *Phytochemistry*, **66**, 1334 – 1345 (2005).
8. S. Katsunori, T. Takashi, *Phytochemistry*, **61**, 339 – 343 (2002).
9. A. B. Durkeet, J. B. Harborn, *Phytochemistry*, **12**, 1085 – 1089 (1973).
10. M. A. Susan Marles, et al., *Phytochemistry*, **62**, 663 – 672 (2003).
11. Geza Hrazdina, R. Alscher, V. M. Kish, *Phytochemistry*, **7**, 1355 – 1359 (1980).

Поступила 11.10.10

QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTICANCEROGENIC SUBSTANCES IN ABOVE-GROUND PARTS OF SOME PLANTS OF BRASSICACEAE FAMILY

M. V. Gavrilin, A. V. Sedin, and S. P. Senchenko

Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy, Pyatigorsk., Russia

Micellar electrokinetic chromatography has been used to determine the content of indole-3-carbinol in aerial parts of some plants of the cabbage (*Brassicaceae*) family. It is established that a high content of indole-3-carbinol (from 1.4 to 1.9%) is inherent in grass of *Brassica napus* L. and leaves of *Brassica rapa* L. In view of the potential use of *Brassica napus* L. as a source of substances with anti-cancer effect, reversed-phase HPLC analysis has been performed that revealed a significant content of flavonoids with the major aglycones of quercetin, kaempferol, and isorhamnetin.

Key words: Micellar electrokinetic chromatography, indole-3-carbinol, flavonoids, Brassicaceae family