ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ЭКСТРАКТОВ ИЗ КАПУСТЫ БРОККОЛИ

Евгения СЕРГИЕНКО, факультет химии и химической технологии

This work is devoted to the investigation of the biologically active substances in broccoli. The extraction of the summ of biologically active substances from broccoli shoots was performed with the use of two solvents: dichloromethane (with the preliminary acidic hydrolysis) and methanol. The presence of isothiocyanates was confirmed by the method of spectrophotometry. In three of four analyzed fractions the sulforaphane was detected by HPLC.

Капуста брокколи хорошо известна в качестве ценного пищевого продукта [1]. Она содержит вещества, обладающие

противораковым действием: дииндолилметан, индол-3-карбинол, глюкорафанин, сульфорафан [2]. Раковые заболевания занимают второе место по числу случаев смертности среди населения планеты [3]. В век развития фармацевтической индустрии немаловажную роль приобретают вещества натурального происхождения. Трудности долгосрочного прогнозирования воздействия на организм человека таких сложных систем, как моноклональные антитела [4], полипептиды, а также сложность и дороговизна их промышленного производства на данном этапе развития науки, открывают широкие возможности для применения веществ натурального происхождения. Так, изотиоционаты (такие, как глюкорафанин) являются многообещающими веществами в борьбе с раковыми заболеваниями [2, 5, 6].

Экстракция и гидролиз. Экстракция суммы биологически активных веществ была проведена с использованием двух растворителей: дихлорметана (с предварительным гидролизом) и метанола. В случае экстракции метанолом, 5,0 г измельчённого на мелкой тёрке растительного сырья (побеги свежей брокколи) залили метанолом (из расчёта 4 мл/1 грамм свежего сырья) и оставили на 18 часов при комнатной температуре для мацерации. Затем раствор отфильтровали через фильтровальную бумагу и дважды экстрагировали порциями по 20 мл холодного (–20°C) 80% метанола.

Экстрагирование каждой пробы проводили в течение 4 часов, каждый раз с частым энергичным встряхиванием. Изотиоцианаты в растениях находятся в связанной с моносахаридами форме, поэтому при экстракции дихлорметаном предварительно был проведён их гидролиз. Так, к 5,0 г измельчённого сырья прилили 20 мл 0,00103 М раствора HCl (pH 3,0), раствор инкубировали в термостате при 35°C в течение 4 часов. Значение pH 3,0 и продолжительность гидролиза в течение 4-х часов наиболее оптимальны для гликозилированных изотиоцианатов. При повышении значения pH эффективность гидролиза, соответственно, снижается, при большей же длительности процесса изменений не наблюдается [7].

Спектрофотометрический анализ. С целью предварительной оценки наличия в полученном метанольном экстракте группы исследуемых веществ был проведён его спектрофотометрический

анализ. Методом Карла Фишера [8] было определено содержание влаги в экстракте, затем, исходя из полученного результата (22,78% влаги), был приготовлен компенсационный раствор для спектрофотометрического анализа, состоящий, соответственно, из 22,78% воды и 77,22% метанола. Был снят спектр поглощения экстракта в области 200-320 нм. В связи с высокой абсорбцией раствора, последний был разведён в 4 раза компенсационным раствором, для того чтобы абсорбция находилась в пределах ~ 0,3-0,5, в области сохранения линейности зависимости поглощения от концентрации раствора и максимальной чувствительности аппарата. Был проанализирован полученный спектр разведённого экстракта: отмечено присутствие пиков, соответствующих сульфорафану (~225 нм) [9], глюкобрассицин-1-сульфонату (273, 290 нм) [10], фенилизотиоцианату (~275 нм) [11], а также наличие множества других пиков ввиду присутствия веществ других классов. Таким образом, предварительно подтверждено присутствие в экстракте группы исследуемых веществ, и ыявлена необходимость последующей очистки экстракта от посторонних классов веществ, экстрагированных бинарной системой метанол-вода.

Колоночная хроматография. Для очистки предложено использование колоночной хроматографии с использованием Florisil® [12] (150-250 μm) в качестве стационарной фазы, в качестве мобильной фазы – дихлорметана, а затем этилацетата. Экстракт был предварительно концентрирован на вакуумном роторном испарителе при температуре 35 °C, давлении 220 мбар, при скорости вращения ротора 230 об./мин.

Полученный концентрированный раствор был налит в чашку Петри и оставлен в темноте под тягой, где благодаря конвекции происходило его концентрирование. Завершающей стадией стало высушивание концентрата до постоянной массы в вакуумном сушильном шкафу при температуре 35°C и давлении ~ 60 мбар.

Высушенный концентрат был растворён в дихлорметане и внесён в подготовленную колонку с силикагелем (Florisil®). Элюирование проводилось сначала дихлорметаном, а затем этилацетатом. Было собрано по 50 мл дихлорметановой и этилацетатной фракции для каждого из экстрактов, соответственно. Необходимость сбора очередной фракции определялась по

присутствию/отсутствию галогена (проба Бейльштейна). Каждая из собранных фракций была концентрирована на вакуумном роторном испарителе, высушена в вакуумном сушильном шкафу и растворена в 10 мл ацетонитрила.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Полученные пробы были профильтрованы через ПТФЭ-мембранный микрофильтр 0,22 мкм и были проанализированы методом ВЭЖХ на хроматографе Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 RSL Cnano System с автосэмплером. Условия хроматографирования были следующими: колонка Zorbax Eclipse 5 XDB-C18 250 x 4,6 mm, 5 μm; мобильная фаза: ацетонитрил – вода (20:80, об./об.); λ = 205 нм; v = 0.5 мл/мин.; t = 25°C.

Время удерживания сульфорафана при данных условиях хроматографирования составило ~15,2 мин. В настройках метода было запрограммировано инжектирование каждой пробы по два раза. Перед инжектированием каждой пробы следующей фракции производилось инжектирование компенсационного раствора. Таким образом, обеспечивалась наилучшая повторяемость результатов, а также исключалась вероятность соотнесения какого-либо постороннего пика с исследуемым веществом.

Результаты анализа методом ВЭЖХ позволяют сделать вывод о том, что метанольный экстракт содержал больше веществ изотиоцианатного строения (сульфорафана-2-сульфоната), чем дихлорметановый, что можно объяснить более полярными свойствами метанола как растворителя.

Однако в дихлорметановом экстракте только лишь в первой (дихлорметановой) фракции было возможно обнаружение сульфорафана. Данный факт можно объяснить, тем, что дихлорметановый экстракт был получен с предварительным кислотным гидролизом, и вторая (этилацетатная) фракция данного экстракта содержала, соответственно, большое количество веществ полярного строения (спирты, альдегиды, кетоны, сахариды и др.), что и послужило тому, что на хроматограмме имелась смесь перекрывающих друг друга пиков, накладывающихся на область времени удерживания сульфорафана и интенсивно поглощающих при заданной длине волны.

Таким образом, при очистке дихлорметанового экстракта методом колоночной хроматографии, оптимальным является использование дихлорметана в качестве элюента – ввиду того, что при элюировании этилацетатом с сорбента смывается обширная группа полярных веществ, образованных в том числе и в результате кислотного гидролиза, что, как следствие, при данных условиях приводит к невозможности детектирования сульфорафана методом ВЭЖХ.

Литература:

1. *Материал национальной базы данных по нутриентам Департамента агрикультуры США* (https://ndb.nal.usda.govndb/foods/show/2871?manu=&fgcd=), 12.10.2015, 19:22.
2. FAHEY, J. W. et al. Sulforaphane Bioavailability from Glucoraphanin-Rich Broccoli: Control by Active Endogenous Myrosinase. In: *DOI: 10.1371/journal.pone.0140963*, November 2, 2015.
3. *Материал сайта*: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/, 17.10.2015, 20:26.
4. PATRICK CHAMES et al. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. In: *British Journal of Pharmacology.* 2009 May; 157(2): 220–233. DOI: 10.1111/j.1476–5381.2009.00190.x.
5. LATTÉ; K. P. et al. Health benefits and possible risks of broccoli – An overview. In: *Food and Chemical Toxicology,* 49 (2011), p. 3288, 3297-3302.
6. RAZIS, A. et al. Intact glucosinolates modulate hepatic cytochrome P450 and phase II conjugation activities and may contribute directly to the chemopreventive activity of cruciferous. In: *Toxicology,* 2010, 277: 74-85.
7. DANDAN HAN, KYUNG HO ROW. Separation and Purification of Sulforaphane from Broccoli by Solid Phase Extraction. In: *International Journal of Molecular Sciences,* 2011, 12(3), 1854–1861.
8. *Государственная Фармакопея Украины*. 1-ое изд. Харьков, 2007, с.146.
9. GINA ROSALINDA DE NICOLA et al. Novel Gram-Scale Production of Enantiopure R-Sulforaphane from Tuscan Black Kale Seeds. In: *Molecules.* 2014, 19, 6975-6986; DOI:10.3390/molecules19066975;
10. MALCOLM C. ELLIOT and BRUCE B. STOVE. Indole Compounds Related to Auxins and Goitrogens of Woad. In: *Plant Physiology,* 1971, 47, p. 370.

11. WALTER J. BALFOUR et al. The 275-nm absorption system of phenyl isocyanate. In: *Journal of Molecular Spectroscopy.*Volume 96, Issue 2, December 1982, p. 306–312.
12. *Материал сайта*: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/220752? Lang=en&region=RO, 11.12.2016, 14:55.